

Untersuchungen zur Motilitäts-
und Geschwindigkeitsmessung von
Bullenspermien mit Hilfe der
Videomikrographie

Peter Riemke

*Diss. München
1983*





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0024

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung
von Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Peter Riemke
aus
Nürnberg

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. I. Rüsse

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Direkte Messung im mikroskopischen Bild	2
2.2. Direkte Auswertung einer Dokumentation des mikroskopischen Bildes	5
2.2.1. Kinematographie	5
2.2.2. Photographie	7
2.2.3. Videotechnik	11
2.3. Indirekte Bewegungsmessung über Absorption bzw. Streuung von Licht- oder Laserstrahlen durch Spermien	12
2.3.1. Lichtabsorption von bewegungsgerichteten Spermien	12
2.3.2. Lichtabsorption oder -reflexion von Spermaproben mit unbeeinflusster Bewegungsrichtung	14
2.3.3. Streuung von Laserstrahlen durch Spermien	15
2.4. Beurteilung der Spermienmigration	16
3. MATERIAL UND METHODE	17
3.1. Versuchstiere	17
3.2. Spermagewinnung	17
3.3. Voruntersuchung des gewonnenen Ejakulates	17
3.4. Verdünnung der Spermaprobe	18
3.5. Beschreibung der Meßanordnung	18
3.5.1. Meßgeräte	18
3.5.2. Aufbau der Meßgeräte	19
3.6. Füllung der Meßkammer	20
3.7. Videoaufzeichnung	20
3.8. Auswertung der Aufnahme	21

II

	Seite
3.8.1.	Vorbereitende Maßnahmen 21
3.8.2.	Motilitätsmessung 21
3.8.3.	Geschwindigkeitsmessung 22
3.9.	Versuchsaufbau 23
3.9.1.	Untersuchungen zur Meßgenauigkeit 23
3.9.2.	Auswirkungen verschiedener Meßtemperaturen bzw. verschiedener Konservierungsarten auf Motilität und Geschwindigkeit 24
3.9.2.1.	Einfluß der Temperatur während der Messung 24
3.9.2.2.	Einfluß einer Flüssigkonservierung 24
3.9.2.3.	Einfluß der Tiefgefrierkonservierung 25
3.9.3.	Einfluß verschiedener pharmakologischer Substanzen auf Motilität und Geschwindigkeit 25
3.9.3.1.	Kallikrein 26
3.9.3.2.	Koffein 27
3.9.3.3.	Epinephrin 27
3.10.	Statistische Methoden 28
4.	ERGEBNISSE 29
4.1.	Untersuchungen zur Meßgenauigkeit 29
4.2.	Auswirkungen verschiedener Meßtemperaturen bzw. verschiedener Konservierungsarten auf Motilität und Geschwindigkeit 33
4.2.1.	Einfluß der Temperatur während der Messung 33
4.2.2.	Einfluß einer Flüssigkonservierung 36
4.2.3.	Einfluß der Tiefgefrierkonservierung 40
4.3.	Einfluß verschiedener pharmakologischer Substanzen auf Motilität und Geschwindigkeit 40
4.3.1.	Kallikrein 40
4.3.2.	Koffein 43
4.3.3.	Epinephrin 43

III

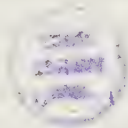
Seite

5.	DISKUSSION	49
6.	ZUSAMMENFASSUNG	56
7.	SUMMARY	58
	"Investigations concerning the measurement of motility and velocity in bull spermatozoa with the aid of videomicrography"	
8.	LITERATURVERZEICHNIS	60
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Die Beurteilung der Motilität ist ein zentraler Punkt der Spermauntersuchung. Dabei wird unter "Motilität" in den meisten Fällen der durch Schätzung im mikroskopischen Bild ermittelte Prozentsatz beweglicher Spermien verstanden. Über die Geschwindigkeit der Spermien und deren biologische Bedeutung ist dagegen, vor allem in der Veterinärmedizin, wenig bekannt. Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe von Untersuchungsmethoden, mit denen beide Bewegungskriterien objektiv festgehalten werden können. Bisher hat jedoch keines der Verfahren in den Routinebetrieb der Spermauntersuchung, z.B. an Besamungsstationen, Eingang gefunden.

Ziel dieser Untersuchungen war es, an Hand eines bekannten Verfahrens zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung bei Bullenspermien, die Möglichkeiten und Grenzen einer derartigen Methode auszuloten. Gleichzeitig sollte aber auch versucht werden, die Bedeutung der Spermengeschwindigkeit, insbesondere auch ihre Beziehung zur Motilität, näher zu beschreiben. Als Methode wurde die Videomikrographie gewählt, weil der apparative Aufwand (Videorecorder etc.) auch eine Anwendung in der Praxis erlauben würde und andererseits Aufnahme und Auswertungsmodus technisch relativ einfach sind.



2. LITERATUR

Versuche, die Motilität von Spermien zu messen, reichen bis in das neunzehnte Jahrhundert zurück. Die dazu verwendeten Einrichtungen sind demzufolge fast ein Spiegelbild der technischen Entwicklung von damals bis heute. War anfangs ein Mikroskop alleiniges Hilfsmittel, reicht heute die Palette von der Videoeinrichtung über die Lasertechnik, einschließlich einer Auswertung mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung.

2.1. Direkte Messung im mikroskopischen Bild

HENLE (1841) benutzte den Durchmesser des Gesichtsfeldes im Mikroskop als Meßstrecke, um die Geschwindigkeit von menschlichen Spermien zu messen. Für 1 Zoll benötigten die beurteilten Spermien 7,5 Minuten, was einer Geschwindigkeit von 0,056 mm/Sekunde entspricht. In ähnlicher Weise ermittelte LOTT (1872) für Hundespermien eine Geschwindigkeit von 0,060 mm/Sekunde; er verwendete als Maßeinheit die Breite eines Deckglases.

VIERORDT (1888) faßte die bis dahin ermittelten Geschwindigkeiten von Spermien verschiedener Spezies in einem Tabellenwerk zusammen. Dabei ergab sich kein Speziesunterschied.

Ein erster Schritt zu zuverlässigeren Aussagen wurde von ADOLPHI (1905) getan. Er baute ein doppeltes Fadenkreuz in das Okular ein, das dann durch Drehung der Schwimmrichtung des jeweiligen Spermiums angepaßt werden konnte. Die Zeitnahme erfolgte durch Mitzählen bei einem tickenden Sekundenpendel. Bei "langsamen" Spermien mußte die Strecke pro Sekunde geschätzt werden. Die Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur (15 - 17°C) durchgeführt. Für Bullenspermien aus dem Nebenhoden betrug bei dieser Methode die Geschwindigkeit 60 μ m/Sekunde, für Schaf spermien 50 μ m/Sekunde.

LLOYD-JONES und HAYES (1918) führten ihre Untersuchungen an verdünntem Nebenhodensperma von Kaninchen durch. Sie verwendeten

eine Zählkammer und bestimmten die Zeit, die ein Spermium benötigte, um eine bestimmte Strecke zu durchschwimmen mit einer Stoppuhr. Sie ermittelten eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$. LLOYD-JONES und HAYES wiesen zum ersten Mal auf den Einfluß der Temperatur für die Spermengeschwindigkeit hin und maßen der Motilität der Spermien eine hohe Aussagekraft bezüglich der Fertilität eines Vartieres bei.

Die bereits geschilderte Methode von ADOLPHI (1905) griffen MOELLER und VAN DEMARK (1956) wieder auf, die ebenfalls ein Okular mit kalibrierten Linien verwendeten. Ein Spermatropfen aus einem frischgewonnenen Ejakulat eines Bullen wurde auf einem Objektträger mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt und ein Deckglas leicht aufgedrückt. Die Untersucher beurteilten jeweils die Wegstrecke von 10 Spermien innerhalb von 45 Sekunden in 4 Gruppen pro Ejakulat. Sie erhielten eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 114 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$. Die Varianz der Geschwindigkeit zwischen den Gruppen war geringer als zwischen den Ejakulaten. Die Gesamtvergrößerung im mikroskopischen Bild beeinflusste das Ergebnis der Geschwindigkeitsmessung signifikant. Es bestand kein Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Motilität (= Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien). Nach Ansicht der Autoren war ihr Verfahren eine schnelle, billige und einfache Meßmethode. Es mußte jedoch in Kauf genommen werden, daß eine Beeinflussung der Ergebnisse von Seiten des Untersuchers (subjektive Auswahl der Spermien, Reaktionszeit des Untersuchers bei Start und Stop, Handhabung des Okulars) und der Meßanordnung (Spermien schwimmen nicht in einer Ebene, variable Geschwindigkeit eines Spermiums) vorhanden war.

BAKER et al. (1957) sowie TAMPION und GIBBONS (1963) benutzten als Meßstrecke den Abstand der Linien einer Zählkammer. Sie kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während die erstgenannten Autoren bei Bullenspermien eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 70,5 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ feststellten, beobachteten TAMPION und GIBBONS Geschwindigkeiten zwischen 107 und 203 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ In diesen Untersuchungen wurde bereits der Einfluß verschiedener Verdünner und Verdünnungsstufen auf die Spermengeschwindigkeit berücksichtigt. Mit

steigender Verdünnungsrate sank die Geschwindigkeit und gleichzeitig nahm der Prozentsatz motiler Spermien ab.

Die von BAKER et al. (1957) beschriebene Meßanordnung verwendeten BARTAK (1971) für Humansperma und OJAKIAN und KATZ (1973) für Protozoen (*Chlamydomonas*), allerdings mit einem anderen Auswertungsmodus. Die Untersucher beobachteten, wieviele Zellen in der Zeiteinheit ein bestimmtes Segment der Zählkammer passierten und berechneten daraus die Durchschnittsgeschwindigkeit. OJAKIAN und KATZ (1973) verglichen diesen Wert mit einer direkt ausgewerteten Videoaufzeichnung, sie fanden eine gute Übereinstimmung.

KATZ und DOTT (1975) benutzten eine mathematische Transformation, nämlich die sog. "probably after"-Statistik, die ROTHSCCHILD (1953b, siehe auch 2.2.1.) erstmals zur Berechnung der Spermien-geschwindigkeit verwendet hatte. Als Parameter diente die Veränderung der Spermienzahl innerhalb eines Feldes des mikroskopischen Bildes in bestimmten Zeitabständen. Die Zählung der Spermien erfolgte automatisch durch einen Computer. Diese Daten mußten aber noch in einen Rechner übertragen werden, der dann die Geschwindigkeit der Spermien errechnete (Bulle: 68 - 162 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$).

In einer Weiterentwicklung des Verfahrens wurde nicht mehr die Zahl der durch ein Segment schwimmenden Spermien direkt bestimmt (DOTT und FOSTER 1979). Statt dessen wurden die Graustufenänderungen gemessen, die von durch das mikroskopische Bild schwimmenden Spermien verursacht wurden. Diese Graustufen wurden 180 mal in 30 Sekunden gemessen, danach wurde über eine sog. Platzwechsel-frequenz ein Wert für die Bewegungsintensität in der Spermaprobe berechnet. Bei dichten Ejakulaten (Bulle, Schafbock) wurde die Massenbewegung im Hellfeld beurteilt, bei anderen Spezies, z.B. Pferd, Schwein, Kaninchen, die Bewegung der einzelnen Spermien im Dunkelfeld.

2.2. Direkte Auswertung einer Dokumentation des mikroskopischen Bildes

2.2.1. Kinematographie

Die Möglichkeiten der filmischen Dokumentation des mikroskopischen Bildes und damit auch einer zeitversetzten und jederzeit wiederholbaren Auswertung nutzten erstmals SCHLENK und KAHMANN (1935). Forellenspermien, die in einer Kammer mit 1 mm Tiefe schwammen, wurden mit einer bestimmten Bildgeschwindigkeit gefilmt. Durch eine besondere Beleuchtungseinstellung im Dunkelfeld erschienen die Spermien als Scheibchen, deren Krümmungsradius von der Schwimmebene innerhalb der Kammer abhängig war. Bei der Auswertung der einzelnen Filmbilder an der Projektionswand konnte deshalb nicht nur die Geschwindigkeit in horizontaler Richtung bestimmt werden, sondern auch die vertikale Bewegung mit Hilfe des Krümmungsradius der "Spermienscheibchen".

Zur Verbesserung der Abbildung einzelner Spermien sowohl im Dunkelfeld als auch im Phasenkontrast, verwendeten RICKMENSPOEL und VAN HERPEN (1956) ein Ring-Blitzlicht, das synchron mit der Bildfrequenz (50 Bilder/Sekunde) der Kamera aufleuchtete. Die Auswertung der Einzelbilder erfolgte dann durch direkte Messung der Wegstreckenlänge an der Projektionswand.

ROTHSCHILD (1953b) benutzte zwar ebenfalls die Dunkelfeldkinematographie zur Dokumentation des mikroskopischen Bildes, beschritt aber bei der Auswertung einen anderen Weg. Der Film wurde Bild für Bild auf ein Papier mit einem eingezeichneten, kalibrierten Kreis projiziert. Der Untersucher zählte nun die Spermien pro Bild, die sich im Kreis befanden. Die Veränderung der Spermienzahlen im Kreis pro Bild und die Bildfrequenz gingen in eine mathematische Formel ein, mit der die Geschwindigkeit der Spermien berechnet werden konnte, z.B. für Bullenspermien durchschnittlich 111 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$. Diese als "probably after" bezeichnete statistische Methode benutzten später auch KATZ und DOTT (1975; siehe Kap. 2.1.).

Neben der objektiven Feststellung der Spermengeschwindigkeit und der Motilität, kristallisierte sich die Kinematographie vor allem als Methode der Wahl für detaillierte Bewegungsstudien einzelner Spermien heraus. Je mehr Einzelbilder pro Zeiteinheit gemacht werden konnten, desto genauer ließen sich Bewegungsphasen, besonders auch pathologischer Art, analysieren. Dies führte zur Entwicklung der Hochfrequenz-Kinematographie. EYKHOUT und RICK-MENSPOEL (1960) verwendeten als erste ein photomechanisch gesteuertes Elektronenblitzgerät mit 200 Bildern/Sekunde. PHILLIPS (1972) benutzte sogar bis zu 500 Bilder/Sekunde, um Bewegungsformen bei Spermien von Maus, Hamster und Kaninchen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Hochfrequenz-Kinematographie verglichen KATZ et al. (1978) bei Humanspermien die Schlagfrequenz mit der Geschwindigkeit. Sie fanden für beide Parameter im Nativsperma und im verdünnten Samen eine lineare Korrelation. Im Cervixmucus war jedoch diese Beziehung nicht mehr in gleichem Ausmaß gegeben.

Die Nachteile der Hochfrequenz-Kinematographie lagen vor allem in ihrem zeitraubenden und umständlichen Auswertungsmodus. Um eine automatische Auswertung der Einzelbilder zu ermöglichen, wurde von LIU und WARME (1977) eine Videoaufzeichnung der Einzelbilder vorgenommen. Die Auflösung des Fernsehbildes in Punkten erlaubte nun eine Datenaufnahme und -verarbeitung über Computer. Durch einen automatischen Vergleich der ersten mit den nachfolgenden Bildern konnten damit bis zu 30 Spermien pro Bild hinsichtlich Motilität und Geschwindigkeit in weniger als 3 Minuten ausgewertet werden. Mit dem gleichen System arbeiteten auch AMANN und HAMMERSTEDT (1980). Die Autoren benutzten eine Grenzggeschwindigkeit von $35 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$, um zwischen motilen und nicht-motilen Spermien zu differenzieren. Für motile Bullenspermien wurde eine Geschwindigkeit von $69 - 95 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$ ermittelt. Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wies eine hohe Korrelation zum Anteil nicht gefärbter, lebender Spermien in einer Vitalfärbung auf. Allerdings wurde die Meßgenauigkeit dieser Methode mit einem steigenden Anteil immotiler Spermien geringer. Eine weitere Einschränkung dieser Meßmethode ergab sich aus den Untersuchungen von

AMANN und O'CONNOR (1980), die beobachteten, daß bei der computergestützten Auswertung auch unbewegliche Spermien als motil eingestuft werden. So wurde in Proben mit ausschließlich unbeweglichen Zellen eine Motilität von 31 % ermittelt, wobei als Fehlerquelle nur die Datenverarbeitung des Videobildes in Frage kam. CRAIG et al. (1982) verwendeten statt eines Videobildes einen Laserstrahl zur Abtastung der projizierten Filmbilder um pathologische Bewegungsformen zu analysieren.

2.2.2. Photographie

Die Auswertung von Photoaufnahmen zur Berechnung von Motilität und Geschwindigkeit beruht auf 2 verschiedenen Prinzipien. Bei einmaliger Belichtung und nicht zu kurzer Belichtungszeit bilden sich motile Spermien in Form einer Spur ab, während unbewegliche Spermien scharf dargestellt werden. Aus der Länge der Spuren der beweglichen Zellen kann die Geschwindigkeit errechnet werden. Das Verhältnis von motilen zu immotilen Spermien ergibt sich direkt aus der Aufnahme. Belichtet man mehrmals kurz hintereinander, werden die Köpfe motiler Spermien in einer Reihe, abhängig von der Zahl der Belichtungen, abgebildet. Die Köpfe unbeweglicher Spermien dagegen verändern ihre Position nicht. Der Vorteil dieser Methode liegt wahrscheinlich in der besseren Kennzeichnung der Wegstrecke durch die scharf abgebildeten Spermienköpfe, gegenüber der unter Umständen sehr unscharfen Spermienspur bei längerer Belichtungszeit. Die Auswertung ist bei beiden Systemen einheitlich. Das entwickelte Negativ wird auf ein Papier projiziert, die zurückgelegte Strecke mit einem Stift nachgezeichnet und mit einem Kurvenlineal ausgemessen. Durch Umrechnung dieser Strecke auf tatsächliche Größenverhältnisse erhält man unter Berücksichtigung der Zeit die Geschwindigkeit.

ROTHSCHILD (1953a) arbeitete als erster mit der "einmaligen Belichtung". Er stellte auf der Photoplatte die Fortbewegung von Seeigelspermien proportional zu verschiedenen Belichtungszeiten

fest. Eine Belichtungszeit von $1/5$ Sekunde diente MÜLLER und SZILAGYI (1964) zur Messung der Motilität und der Geschwindigkeit von Bullenspermien. Pro Ejakulat kamen in 4 Aufnahmen je 5 Spermien zur Auswertung. Aus 9 Ejakulaten wurde eine durchschnittliche Geschwindigkeit von $62 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ ermittelt.

Mit einer ähnlichen Meßanordnung wie der von ROTHSCILD (1953a) konnten JANICK und MacLEOD (1970) bei Humanspermien eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Meßtemperatur nachweisen. Diese Beobachtung wurde von MILLIGAN et al. (1978) bestätigt, die einen Temperaturbereich von 25 bis 40°C überprüften. Im Gegensatz zu dem nahezu gleichmäßigen Anstieg der Spermengeschwindigkeit war bei der Motilität keine Veränderung festzustellen.

Während MILLIGAN et al. (1978) eine Belichtungszeit von 2 Sekunden und eine Filmempfindlichkeit von 125 ASA verwendet hatten, versuchten REVELL und WOOD (1978) durch eine Verkürzung der Belichtungszeit auf nur 1 Sekunde und eine Filmempfindlichkeit von 400 ASA die Abbildungsqualität der Aufnahmen zu verbessern. Ihre Untersuchungen an Tiefgefriersperma von Bullen führten zu dem Schluß, daß diese Methode zuverlässige Aussagen über die Qualität von Tiefgefriersperma ermöglicht.

Durch die Verwendung einer Kammer mit nur $20 \mu\text{m}$ Tiefe, die damit eine Vertikalbewegung der Spermien weitgehend ausschloß, verbesserten OVERSTREET et al. (1979) die Meßgenauigkeit und erreichten außerdem eine gleichmäßigere Bildschärfe aller abgebildeten Spermien. An einem eigens dafür gebauten Projektionstisch wurden für die Motilitätsbeurteilung pro Ejakulat 7 Gesichtsfelder à 50 Spermien und für die Geschwindigkeitsbestimmung 15 Spermien ausgewertet. Außerdem ermittelten die Untersucher Parameter wie den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher (= alle Spermien $\sim 25 \mu\text{m}/\text{Sek.}$), die durchschnittliche Geschwindigkeit vorwärtsbeweglicher, den Prozentsatz der geradeausschwimmenden, der ortsbeweglichen und der seitwärtsbeweglichen Spermien.

Das eingangs erwähnte zweite Aufnahmeprinzip mit mehreren Belichtungen pro Bild entwickelten BROWN und POPPLE (1955). Später

verwendete es auch GRAY (1958). Hierbei war in dem Strahlengang des Mikroskops ein Stroboskop eingebaut, das im Abstand einer achtzigstel Sekunde den Film 3 - 8 mal belichtete. Auf diese Weise wurde von Bullensperma eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 94 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ gemessen.

LUSTIG und LINDAHL (1970) arbeiteten mit 3 Belichtungen je Bild. Pro Ejakulat wurden 400 Zellen ausgewertet. Beim Bullen konnten sie damit eine durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien von 62 - 92 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ ermitteln. ELLIOT et al. (1973) belichteten den Film 6 mal innerhalb von 2 Sekunden. Sie verglichen ihre Methode mit den Resultaten gleichzeitig durchgeführter visueller, subjektiver Messungen und erhielten vergleichbare Ergebnisse.

Ein wesentlicher Nachteil aller bisher geschilderten Methoden war, daß die Bewegung der Spermien auf Grund der relativ hohen Schichtdicke in der Kammer bzw. unter dem Deckglas in allen 3 Dimensionen möglich war, die Auswertung jedoch auf der Annahme einer ausschließlich horizontalen Bewegung beruhte. Diesen Nachteil konnte MAKLER (1978a) durch die Verwendung einer nur 10 μm tiefen Kammer weitgehend eliminieren. Die Schichtdicke von 10 μm erlaubte noch eine ungehinderte Vorwärtsbewegung der Spermien, schloß aber eine Vertikalbewegung nahezu aus (MAKLER 1978b). Zugleich wurde damit eine gleichmäßig scharfe Abbildung aller Spermien in einem Blickfeld erreicht. Die mehrmalige Belichtung einer Aufnahme erfolgte durch ein Stroboskop, das den Lichtstrahl des Mikroskopes 6 mal in einer Sekunde unterbrach (multiple exposure photomicrography = MEP; MAKLER 1980a). Zur Auswertung wurde das Negativ der Aufnahme auf Papier projiziert, die Wegstrecke der Spermien nachgezeichnet und dann gemessen. Pro Spermaprobe wurden 200 - 400 Spermien ausgewertet. Mit dieser Methode erarbeitete der Autor erstmals ein umfassendes Datenmaterial über Motilität und Geschwindigkeit von menschlichen Spermien unter verschiedenen physiologischen und experimentellen Bedingungen. So konnte gezeigt werden, daß die Motilität 1 Stunde nach der Ejakulation beginnend, kontinuierlich um 5 - 10 % pro Stunde abfällt, die Ge-

schwindigkeit der Spermien jedoch noch bis zur 4. Stunde nach der Ejakulation ansteigt und erst dann nachläßt (MAKLER et al. 1979a). Dies führte zur Entwicklung eines Index, bei dem Motilität und Spermengeschwindigkeit nach 4 Stunden in Beziehung zum Ausgangswert gesetzt wurden (MAKLER 1979a). Zwischen dem Anteil mißgebildeter Spermien und der Motilität sowie der Geschwindigkeit wurde eine negative Korrelation festgestellt (MAKLER et al. 1979b). Die Verdünnung eines Ejakulates führte zu einem signifikanten Abfall der Geschwindigkeit, nicht aber der Motilität. Den stärksten Einfluß auf die Geschwindigkeit hatte eine Verdünnung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, die eine Reduzierung um 37 % bewirkte (MAKLER et al. 1979c).

Den nach wie vor arbeitsintensiven Auswertungsmodus versuchten MAKLER et al. (1980b) durch die Einführung eines an einen Computer angeschlossenen Digitalisiertisches zu verbessern. Dabei wurden die vorher bereits aufgezeichneten Linien bzw. Punkte mit einem Sensorstift auf dem Digitalisiertisch nachgezogen und damit die Daten in einen Computer eingegeben.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wurde durch die Einbeziehung einer Vitalfärbung während der Aufnahme erschlossen. Eine mit Eosin versetzte Spermaprobe wurde mit Farbfilm und einem Grünfilter photographiert. Da die lebenden Spermien den Farbstoff nicht aufnahmen, erschienen sie auf dem Photo grün, tote Spermien dagegen rot. Auf diese Weise konnten lebende motile, lebende imotile und tote Spermien differenziert werden (MAKLER 1979b).

Zur besseren Markierung von Beginn und Ende einer Spermienspur entwickelten LYSIKIEWICZ und ENHORNUNG (1983) eine sog. 3-Farben-Photographie. Auch sie verwendeten die sog. MAKLER-Kammer. Die in der Kammer befindlichen Spermien wurden 1 Sekunde mit grünem Licht aufgenommen. Dann folgte bei weiterhin geöffneter Kameraoptik eine Blitzaufnahme mit Rotfilter und 0,05 Sekunden später ein zweiter Blitz mit Blaufilter. Das entwickelte Farbdia wurde mit bekannter Vergrößerung auf ein Stück Papier projiziert. Nicht motile Spermien zeigten sich wegen des additiven Effektes der Farben als weiße Punkte, motile Spermien wurden als grüne Spur mit einem rot-blauen Abschluß abgebildet.

Ein von allen bisher in diesem Abschnitt besprochenen Methoden abweichendes Abbildungsprinzip entwickelte CASTENHOLTZ (1974). Das mikroskopische Bild wurde auf einen gleichmäßig bewegten Film aufgenommen. Zwischen dem Film und dem Objektbild befand sich eine Spaltblende, deren Schlitz senkrecht zur Bewegungsrichtung des Filmes stand. Dies führte dazu, daß nicht motile Spermien als parallel zur Filmrichtung verlaufende Streifen erschienen. Motile Spermien zeigten eine ihrer Bewegungsrichtung entsprechende Abweichung zur Achse der Filmrichtung. Eine Geschwindigkeitsmessung war mit dieser Methode zwar möglich, eigentliches Ziel aber war die gute Differenzierung zwischen beweglichen und unbeweglichen Spermien.

2.2.3. Videotechnik

Durch die rasche Entwicklung der Videotechnik wurde auch dieses Verfahren für die Dokumentation des mikroskopischen Bildes greifbar. Es interessierte dabei vor allem die Auflösung des Videobildes in Reihen und Punkte, die die Möglichkeit einer automatischen Auswertung gestattete (JECHT und RUSSO 1973). Dazu wurden Aufnahmen der Einzelbewegung der Spermien auf Videoband überspielt. Die darauf abgebildeten Vorgänge wurden in einem besonderen Analysensystem in Digitaldaten transformiert und von einem Computer ausgewertet. Diese Methode wurde speziell zur Bestimmung der Motilität in Humansperma-Proben vorgeschlagen.

Auch LIU und WARME (1977) versuchten ursprünglich kinematographische Aufnahmen durch nochmalige Aufnahme mit einer Videokamera einer automatischen Auswertung zuzuführen. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls die Geschwindigkeit von Humanspermien gemessen, wobei für die Auswertung von 30 Spermien 3 Minuten benötigt wurden.

Eine konventionelle Auswertung über Wegstreckenmessung mit Hilfe einer Videoaufzeichnung beschrieb erstmals MASSANYI (1977). Dazu wurde einfach die zurückgelegte Wegstrecke mit einem Stift

auf dem Monitorschirm nachgezeichnet und danach gemessen, wie lange das Spermium benötigte, diese Strecke zu durchschwimmen. Im Gegensatz dazu verwendeten KATZ und OVERSTREET (1981) eine einer Zielscheibe ähnliche Klarsichtfolie, die auf den Bildschirm gelegt wurde. Damit konnte die Wegstrecke der Spermien direkt abgelesen werden, wenn das Bild jeweils um eine Zeiteinheit weiterlief. Die Autoren heben hervor, daß die apparative Ausrüstung gegenüber anderen Verfahren nicht aufwendig ist und die Bedienung keine Schwierigkeiten bietet. Auch die Auswertung wird als einfach und schnell bezeichnet. Allerdings wurden pro Ejakulat jeweils die Motilität und Geschwindigkeit nur an 50 Spermien erfaßt.

2.3. Indirekte Bewegungsmessung über Absorption bzw. Streuung von Licht- oder Laserstrahlen durch Spermien

Bei den vorher beschriebenen Methoden wurden die Geschwindigkeit bzw. die Motilität der Spermien durch direkte Beobachtung einer größeren Anzahl von Einzelspermien ermittelt. Auf den damit verbundenen arbeitsintensiven Auswertungsmodus wurde wiederholt hingewiesen. Es ist daher verständlich, daß schon immer Bemühungen erfolgten, durch einen indirekten Parameter, wie z.B. die Lichtabsorption der Spermien, zu einer Aussage über die Motilität zu kommen.

2.3.1. Lichtabsorption von bewegungsgerichteten Spermien

Durch das Phänomen der Wolkenbildung und der Massenbewegung von Bullenspermien angeregt, untersuchte WALTON (1952) deren Lichtabsorption. Er benutzte eine 100 µm tiefe Kammer, durch die ein Lichtstrahl senkrecht zur Schwimmebene der Spermien ging. Das Licht wurde von einer Photozelle aufgefangen und über ein Galvanometer als bestimmte Stromspannung angezeigt. Diese Spannung war

infolge der vollkommen ungerichteten Bewegungsrichtung der einzelnen Spermien konstant. Wurde nun in der Kammer ein Fluß erzeugt, orientierten sich die motilen Spermien gegen den Strom (Rheotaxis), was wiederum eine Verminderung der Lichtabsorption und damit auch eine Spannungsänderung bewirkte. Sobald der Fluß gestoppt wurde, stellte sich erneut eine vollkommen ungeordnete Bewegung der Spermien und damit ein Spannungsabfall ein. Je kürzer die Zeit war, in der die Stromspannung zum Ausgangswert zurückkehrte, desto höher mußte der Anteil beweglicher Spermien sein. So wurde auch tatsächlich in Bullenejakulaten mit zunehmender Lagerungsdauer ein Anstieg der Reorientierungszeit von 1 Sekunde 15 Minuten nach der Ejakulation bis auf 80 Sekunden nach 6 Stunden festgestellt. GLOVER (1978) untersuchte mit einer ähnlichen Meßanordnung 1100 Bullenejakulate im Rahmen eines Routinebetriebes einer Besamungsstation. Im Vergleich mit der visuellen, subjektiven Motilitätsschätzung erwies sich diese Methode als sehr zuverlässig.

Während bei WALTON (1952) der Lichtstrahl senkrecht zur Schwimmebene der Spermien gerichtet war, ließen TIMOURIAN und WATCHMAKER (1970) das Licht parallel zur Strömungsrichtung in die Kammer einfallen. Dabei gingen sie davon aus, daß, wenn die Lichtstrahlen und die Spermien sich in gleicher Richtung bewegen, die optische Dichte gleichförmiger ist und damit der Ausgangswert konstanter ermittelt wird. Die Autoren berechneten aus den verschiedenen Spannungsstufen während der Messung einen Motilitätsindex, der proportional zur Motilität der Spermaprobe sein soll. WALL und BOONE (1972) konnten mit Hilfe dieses Index eine sehr gute Übereinstimmung zur subjektiven Motilitätsschätzung an Geflügelspermien nachweisen. Später wurde diese Methode auch zur Motilitätsmessung von Humansperma (ATHERTON 1977, ATHERTON et al. 1979) und Tiefgefrier-Sperma von Bullen eingesetzt (AREFEV et al. 1978).

Methodische Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Parameter innerhalb der Meßanordnung auf das Ergebnis ergaben, daß vor allem die Wellenlänge des Lichtes, die Flußrate und die Spermien-

konzentration von Bedeutung sind (WALL et al. 1980). Die besten Ergebnisse wurden bei 550 nm Wellenlänge, 4 ml/Minute Flußrate und 29×10^6 Spermien/ml erzielt.

2.3.2. Lichtabsorption oder -reflexion von Spermaproben mit unbeeinflusster Bewegungsrichtung

Als Maß für die Massenbewegung in Bullen- und Schafbocksperma versuchten BAR-SAGIE et al. (1980) die Lichtreflexion einer Spermaprobe in Beziehung zur Intensität der Bewegungsaktivität zu setzen. Ein Lichtstrahl wurde über ein Filter von 366 nm Wellenlänge und einen Glasfaserstab auf eine Spermaprobe gerichtet und das reflektierte Licht in einem Photomultiplier verwertet. Die Intensität der Lichtreflexion als Maß für die Massenbewegung nahm z.B. mit steigender Temperatur zu, ebenso nach Zugabe von Fruktose oder Koffein. Dieses Meßprinzip ist aber an Spermaproben mit hoher Spermiedichte gebunden.

Um auch Proben mit niedrigeren Spermienkonzentrationen messen zu können, benutzten BOSSELMAR und SPRONK (1952) einen Photomultiplier, der die von einzelnen motilen Spermien ausgehenden Lichtsignale als Spannungsänderungen registrierte. Das mikroskopische Bild wurde auf einen Bildschirm projiziert, in dessen Mitte sich eine kalibrierte Öffnung befand, hinter der der Photomultiplier stand. Mit Hilfe eines Diskriminators konnten Fehlsignale eliminiert werden, so daß nur Signale einer bestimmten Größenordnung gezählt wurden. Mit dieser Meßanordnung konnten Rückschlüsse auf die Dichte und die Motilität in der Spermaprobe gezogen werden, jedoch war die Meßgenauigkeit nicht befriedigend (BOSSELMAR et al. 1955). Durch verschiedene methodische Änderungen gelang es RICKMENSPOEL (1957), die Empfindlichkeit und die Genauigkeit dieser Methode soweit zu erhöhen, daß sogar zwischen den Signalen von Spermienkopf und Spermienchwanz unterschieden werden konnte. Der Autor konnte damit pathologische Bewegungsformen charakterisieren und gleichzeitig durchgeführte kinematographische Untersuchungen (siehe 2.2.1.) ergänzen.

In der Folgezeit wurden mit dieser Methode auch Geschwindigkeitsmessungen durchgeführt (VAN DEMARK et al. 1958, VAN DUIJN und RICKMENSPOEL 1960).

2.3.3. Streuung von Laserstrahlen durch Spermien

JOUANNET et al. (1977) benutzten erstmals die durch die Streuung eines Laserstrahles an den Spermien entstehenden Frequenzverschiebungen im Sinne eines Dopplereffektes zur Motilitätsmessung. Ein monochromatischer Laserstrahl wurde senkrecht auf eine Spermaprobe gerichtet und das dadurch gestreute Licht von einem Photomultiplier empfangen. Das durch die Streuung entstandene Frequenzspektrum wurde analysiert. Es ermöglichte Aussagen über die Spermiedichte, den Prozentsatz motiler Spermien, die Durchschnittsgeschwindigkeit sowie die Geschwindigkeitsverteilung innerhalb einer Spermaprobe.

Mit einer leicht veränderten Geräteanordnung untersuchten STEINER et al. (1977) die Motilität und die Geschwindigkeit von Humanspermien unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die Autoren konnten mit dieser Methode einen positiven Effekt von Glukose und Koffein auf die Spermatozoengeschwindigkeit nachweisen. Die durch die Streuung des Laserlichtes ausgelöste Frequenzverschiebung ist so charakteristisch, daß z.B. pathologische Bewegungsformen, vor allem Kreisschwimmer, erkannt und analysiert werden können (CRAIG et al. 1982). HALLET et al. (1978) stellten bei Bullenspermien mit kreisförmiger Bewegung eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 86 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ gegenüber 140 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ bei Spermien mit gerader Schwimmrichtung fest. Vergleiche der Lasertechnik mit anderen Methoden der Motilitätsbestimmung ergaben jeweils eine gute Übereinstimmung. In den Untersuchungen von HALLET et al. (1978) wurde zwar die Motilität im Durchschnitt um 11,5 % höher geschätzt, ansonsten war aber eine gute Korrelation zur objektiven Motilitätsmessung gegeben. Beim Vergleich dieser Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung mit photographischen Verfahren

wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt (HARVEY und WOOLFORD 1980, ROSS et al. 1983).

2.4. Beurteilung der Spermienmigration

Für die Beurteilung der Spermengeschwindigkeit diente in den meisten Fällen eine Beobachtung während einer sehr kurzen Wegstrecke, bzw. eine Messung im Sinne einer Momentaufnahme. Um die Motilität vor allem auch in ihrer Bedeutung für die Wanderung in vivo umfassender bewerten zu können, benutzten verschiedene Autoren das Migrationsvermögen in Kapillaren über längere Wegstrecken (Seeigel: GRAVE und DOWNING 1928, Schaf: PHILLIPS und ANDREWS 1937, Eber: TSO 1980). Vor allem im Bereich der Humanmedizin hat dieser Test größere Bedeutung erlangt, allerdings weniger im Sinne einer Methode zur Geschwindigkeitsmessung. Durch die Verwendung von Cervixmucus zur Füllung der Kapillaren wurde dieser Test vor allem als direktes Maß für das Penetrations- und Wanderungsvermögen in vivo verwendet (SCHWARTZ und ZINSSER 1955, KATZ et al. 1978, KATZ und OVERSTREET 1980).

Zur Beurteilung der Motilität wurde auch die Migration von Spermien aus einer spermienhaltigen Suspension in ein spermienfreies Medium herangezogen. Dazu wurde eine Spermaprobe mit spermienfreiem Medium (Seminalplasma, Verdünner etc.) überschichtet und danach in bestimmten Zeitabständen gemessen, wieviel Spermien in die darüberliegende Phase eingewandert waren. Die "Wanderungsintensität" wurde als ein indirektes Maß für die Motilität einer Spermaprobe angesehen (NEVO und MOHAN 1969, SOKOLOSKI et al. 1977). Eine prinzipiell ähnliche Versuchsanordnung benutzten auch GASSNER et al. (1959), allerdings waren hier die spermienhaltige und spermienfreie Phase durch eine Membran getrennt.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Versuchstiere

Es wurden Ejakulate von insgesamt 11 verschiedenen Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh untersucht. Die Bullen waren zwischen 1,5 und 4 Jahre alt und wiesen keine Besonderheiten an den Geschlechtsorganen auf.

3.2. Spermagewinnung

Zur sexuellen Stimulierung wurden vor der Spermagewinnung jeweils zwei sog. Blindsprünge durchgeführt. Die Spermagewinnung erfolgte mit Hilfe einer künstlichen Scheide. Um bei niedrigen Außentemperaturen oder bei einem längeren Transport zum Untersuchungsort größere Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurde ein doppelwandiges Auffanggefäß benutzt, dessen Außenraum mit Wasser von + 20°C gefüllt war.

3.3. Voruntersuchung des gewonnenen Ejakulates

Das Ejakulat wurde subjektiv daraufhin überprüft, ob besondere Veränderungen (z.B. hoher Anteil von Fremdzellen, Agglutinationen) gegeben waren, die die Motilitätsmessung beeinträchtigen könnten. Insbesondere wurde dabei auch eine subjektive Schätzung der Einzelbewegung der Spermien nach den üblichen Kriterien einer Spermauntersuchung durchgeführt, um Einflüsse durch die Verdünnung oder die Füllung der Meßkammer, abschätzen zu können. Außerdem wurde eine Dichtebestimmung mit einer Zählkammer nach TÜRK durchgeführt.

3.4. Verdünnung der Spermaprobe

Um die Wegstrecke einzelner Spermien in der MAKLER-Kammer sicher verfolgen zu können, mußte das Nativsperma für die Messung verdünnt werden. Zur Verdünnung der Spermaprobe wurde ein CUE-Tris-Puffer nach PAUFLER (1974) benutzt. Der angesetzte Verdünner wurde maximal 7 Tage lang verwendet und währenddessen im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt. Enthielt der Verdünner in bestimmten Versuchen auch Eidotter, wurde er jeden Tag frisch angesetzt.

Alle Geräte, die mit Sperma in Kontakt kamen sowie der Verdünner selbst wurden vor Versuchsbeginn in einem Brutschrank bzw. Wasserbad auf + 20°C temperiert.

Das Sperma wurde auf eine Dichte von $40-50 \times 10^3$ Spermien pro mm^3 verdünnt. Dabei wurde zuerst 1 ml Sperma mit einer Pipette in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Unter ständigem Schwenken wurde der Verdünner an der Glasinnenseite, anfangs tropfenweise, dann etwas schneller, zugegeben. So wurde der Verdünner möglichst schonend mit dem Sperma gemischt.

Das Gefäß mit dem verdünnten Sperma wurde während der gesamten Versuche im Wasserbad bei + 20°C aufbewahrt.

3.5. Beschreibung der Meßanordnung

Der Aufbau der Meßgeräte entsprach der von KATZ und OVERSTREET (1981) beschriebenen Anordnung.

3.5.1. Meßgeräte

- a) Ein Monitor (Finnvideo VM 12 FI) mit ca. 32 cm Diagonaldurchmesser des Bildschirms.
- b) Ein Videorecorder (Hitachi VT-5000 ER) mit einer VHS-Kassette (180 Min.).

- c) Eine Zeitschaltvorrichtung für Aufnahme und Wiedergabe (Gemeinschaftsentwicklung mit der Firma Alt/Lohhof) einstellbar auf 0,5, 1 und 10 Sekunden. Zur Eichung der Zeitschaltung diente eine auf den Monitor eingeblendete Digitaluhr mit 1/100 Sekunde Genauigkeit, mit deren Hilfe die Bandlaufzeit überprüft wurde.
- d) Ein Heiztisch (Olympus HT 100).
- e) Ein Mikroskop (Olympus BH-2) mit dem Objektiv S Plan PL 20; 0,46; 160/0,17; Okular 8x und einem Objektträgerheiztisch.
- f) Eine Schwarzweißfernsehkamera (JVC-1K 1500), auf das vorgenannte Mikroskop montiert.
- g) Eine Zählkammer (10 μ m tief, Firma Elop, Zählkammer nach Makler, siehe MAKLER 1980b).

3.5.2. Aufbau der Meßgeräte

Folgende Geräteanordnung von links nach rechts hat sich bewährt:

Brutschrank (20°C), Wasserbad (20°C), Heiztisch (39-40°C), Mikroskop, Monitor, Video-Recorder und Zeitschaltvorrichtung.

Die Videogeräte waren so miteinander verknüpft, daß das von der Fernsehkamera aufgenommene Bild auf dem Monitor sichtbar war und gleichzeitig vom Video-Recorder aufgezeichnet wurde. Am Video-Recorder war zusätzlich die Zeitschaltvorrichtung angeschlossen. Mit einem Phasenkontrast-Objektiv für eine 20-fache Vergrößerung wurde das Bild so fokussiert, daß von einer geschlossenen Makler-Kammer ein scharfes Bild auf den Monitor übertragen werden konnte.

Die Temperatur auf dem neben dem Mikroskop stehenden Heiztisch bzw. auf dem Objektträgerheiztisch wurde um 1 - 1,5°C höher als die verlangte Arbeitstemperatur eingestellt, da die Temperatur der Meßkammer diese Differenz zur Temperatur des Heiztisches aufwies.

3.6. Füllung der Meßkammer

Vor jeder Probenentnahme wurde das Reagenzglas mit dem verdünnten Sperma mehrmals geschwenkt, um eine möglichst homogene Verteilung der Spermien zu erreichen. Mit einer frischen Pipette wurde ein Tröpfchen Sperma in die Kammer eingebracht. Dessen Volumen war so gewählt, daß bei aufgelegtem Deckel nichts über die seitliche Begrenzung des Innenraumes hinausfloß.

Die Kammer wurde unter das Objektiv des Mikroskopes gelegt und das Fernsehbild auf dem Monitor hinsichtlich Schärfe, Kontrast und Helligkeit überprüft. Durch Veränderung der Einstellungen am Mikroskop sowie am Monitor wurde versucht, die beste Wiedergabe zu erreichen.

Bei guter Bildqualität wurde die Probe zunächst im Hinblick auf eine homogene Verteilung der Spermien kontrolliert. Falls zu viele Artefakte, z.B. Luftblasen, Staubteilchen etc. vorlagen, wurde die Kammer erneut gefüllt. Dies geschah auch, wenn gravierende Abweichungen der Spermienmotilität in der Kammer gegenüber der subjektiven Motilitätsschätzung zu Beginn der Untersuchung (siehe 3.3.) gegeben waren.

3.7. Videoaufzeichnung

Die Zeitschaltvorrichtung wurde auf 10 Sekunden eingestellt und der Video-Recorder durch das Drücken der entsprechenden Tasten in Aufnahmebereitschaft versetzt. Die Zeitschaltung stoppte das Videoband und erst bei Auslösung der Zeitschaltung wurde das eingestellte Gesichtsfeld 10 Sekunden lang aufgenommen. So wurden von jeder Probe 10 verschiedene Gesichtsfelder aufgezeichnet. Danach erfolgte ein 10 Sekunden langer Leerlauf des Videobandes, um das Ende einer Serie zu markieren.

Im Versuchsprotokoll wurden die dazu gehörigen Zahlen des Bandzählwerkes verzeichnet.

Nach Abschluß der Aufnahme wurde die Kammer mit warmem Aqua dest. gespült und mit Kleenex-Tüchern abgetrocknet. Damit war die Kammer für die nächste Füllung wieder vorbereitet.

3.8. Auswertung der Aufnahme

3.8.1. Vorbereitende Maßnahmen

Das Videoband wurde auf den Ausgangspunkt zurückgespult. Auf den Fernsehschirm wurde mit einem nicht abwischbaren Filzschreiber eine V-förmige Linie gezogen, die von der rechten oberen Bildecke zum Mittelpunkt des Schirmes und zurück zur rechten unteren Ecke reichte.

3.8.2. Motilitätsmessung

Nach dem Betätigen der Starttaste lief das Videoband durch permanenten Knopfdruck an der Zeitschaltvorrichtung bis zum ersten gültigen Bild des ersten Gesichtsfeldes ab. Dort wurde das Band gestoppt. Auf diesem Standbild wurden, rechts oben beginnend, die ersten 5 Spermien, die entlang der auf dem Bildschirm eingezeichneten V-förmigen Linie lagen, mit einem trocken abwischbaren Filzstift durch jeweils einen Punkt am Spermienkopf gekennzeichnet. Nun lief das Band durch Betätigung der Zeitschaltvorrichtung für die Dauer von 0,5 Sekunden weiter. Alle Spermien, die sich von ihrem Kennzeichnungspunkt entfernten, galten als motil. Die Anzahl der motilen Spermien pro 5-er Gruppe im Gesichtsfeld wurde in eine Tabelle eingetragen und anschließend die Markierungspunkte am Bildschirm abgewischt. Gleich im Anschluß daran wurde im gleichen Gesichtsfeld die Geschwindigkeitsmessung durchgeführt.

3.8.3. Geschwindigkeitsmessung

Für die Messung der Spermengeschwindigkeit auf dem Monitor wurde eine kalibrierte Klarsichtfolie verwendet. Der Mittelpunkt dieser Scheibe war durch ein Fadenkreuz gekennzeichnet und von konzentrischen Kreisen umgeben, die mit einem nicht abwischbaren Filzschreiber oder mit Tusche aufgetragen worden waren. Die regelmäßigen Abstände der Kreise entsprachen in Wirklichkeit 5 μm . Die Graduierung der Folie erfolgte durch Übertragen eines Objektmikrometers.

Die Meßfolie wurde so auf das vorhandene Standbild aufgelegt, daß der Mittelpunkt der Folie unmittelbar hinter dem Kopf des ersten Spermiums rechts oben auf der V-förmigen Linie zu liegen kam. Durch Betätigung der Zeitschaltvorrichtung lief das Band um 1 Sekunde weiter. Die zurückgelegte Strecke des Spermiums wurde direkt abgelesen und in der Tabelle vermerkt. Innerhalb der Population von motilen Spermien konnten fließende Übergänge von fast 0 bis zur jeweiligen Spitzengeschwindigkeit beobachtet werden, allerdings war der Anteil an sehr "langsamen" Spermien jeweils gering. Verschiedene Autoren haben wegen dieses Phänomens eine Grenzggeschwindigkeit zur Erkennung von motilen Spermien eingeführt (OVERSTREET et al. 1979, KATZ und OVERSTREET 1981). Da wegen der verschiedenen Meßtemperaturen in diesen Untersuchungen ein konstanter Grenzwert nicht möglich war, wurde als relativer Wert ein Drittel der ungefähren Durchschnittsgeschwindigkeit in der Spermaprobe angenommen. Spermien mit einer niedrigeren Geschwindigkeit wurden demzufolge nicht in die Auswertung miteinbezogen. Auf diese Weise wurde aus jeder 10-Sekunden-Aufzeichnung die Geschwindigkeit von 5 Spermien gemessen.

Wenn in der 10 Sekunden dauernden Aufzeichnung beim ersten Durchgang keine 5 auswertbaren Spermienbewegungen erfaßt werden konnten, wurde das Band ein Stück zurückgespult und die Aufzeichnungen des gleichen Tropfens erneut verwendet, nun aber entlang einer analogen V-förmigen Linie auf der linken Bildschirmhälfte, bis die Werte von 5 Spermien vorlagen.

3.9. Versuchsaufbau

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Reproduzierbarkeit bzw. der Meßgenauigkeit der Methode. Danach wurde der Einfluß verschiedener Lagerungs- und Meßbedingungen auf die Motilität und Geschwindigkeit von Bullenspermien untersucht. Schließlich sollte noch geklärt werden, ob mit Hilfe der Videomikrographie der Einfluß verschiedener Substanzen, die als motilitätssteigernd gelten, objektiviert werden kann.

3.9.1. Untersuchungen zur Meßgenauigkeit

In einem ersten Abschnitt wurden 10 Ejakulate eines Bullen, die im Abstand von 3 - 4 Tagen gewonnen wurden, untersucht.

Das Sperma wurde eine Stunde nach der Gewinnung wie in 3.4. beschrieben verdünnt. Etwa 15 - 30 Minuten nach der Verdünnung wurden die Videoaufnahmen durchgeführt, so daß die letzte Aufnahme spätestens 2 - 3 Stunden nach der Spermagewinnung erfolgte. Pro Ejakulat wurden 12 Proben à 10 Gesichtsfelder ausgewertet.

Mit der gleichen Anordnung wurde je ein Ejakulat von 7 verschiedenen Bullen gemessen. Die Ejakulate wurden nach der in 3.2. beschriebenen Weise nach einer Deckpause von 3 Tagen gewonnen. Die Innentemperatur der Makler-Kammer betrug bei diesen Messungen + 38°C.

3.9.2. Auswirkungen verschiedener Meßtemperaturen bzw. verschiedener Konservierungsarten auf Motilität und Geschwindigkeit

3.9.2.1. Einfluß der Temperatur während der Messung

In einem Vorversuch wurde ein Ejakulat zunächst nach der Verdünnung bei + 20°C gelagert. Anschließend wurden pro Temperaturstufe von 1°C im Bereich zwischen + 20°C und + 44°C je 10 Gesichtsfelder einer Kammerfüllung auf Band aufgezeichnet und ausgewertet. In jeder Temperaturstufe kam eine neue Probe des verdünnten Ejakulates zur Verwendung.

Nach den in diesem Versuchsabschnitt gewonnenen Erkenntnissen wurden 4 Temperaturstufen für umfangreichere Untersuchungen ausgewählt: + 20°C, + 26°C, + 32°C und + 38°C. Untersucht wurden diesmal je 3 Ejakulate von 3 Bullen. Nach der Gewinnung, Verdünnung und Aufbewahrung im Wasserbad bei + 20°C wurden in den 4 Temperaturstufen von jedem Ejakulat je 6 verschiedene Proben à 10 Gesichtsfelder aufgezeichnet. Die Aufnahmen waren spätestens 3 Stunden nach der Spermagewinnung abgeschlossen.

3.9.2.2. Einfluß einer Flüssigkonservierung

Von 3 Bullen wurde je ein Ejakulat untersucht. Die Verdünnung des Spermas erfolgte in diesem Versuch kurz nach der Gewinnung bei + 20°C mit einem CUE-Tris-Verdünner (nach PAUFLER 1974), dem 20 % Eidotter zugesetzt wurden. Das so verdünnte Sperma wurde auf 3 Gläser aufgeteilt. Zwei davon dienten für die Kurzzeitlagerung, die dritte Probe stand für die Videoaufnahmen zur Verfügung, die spätestens 3 Stunden nach der Gewinnung abgeschlossen waren. Bei den anderen beiden Proben erfolgte die Herabsetzung der Arbeitstemperatur von 20°C auf 5°C langsam in einem Wasserbad. Nach 24 bzw. 72 Stunden, wurde die jeweilige Probe gründlich und vorsichtig durchmischt und jeweils 6 Tropfen à 10 Gesichtsfelder, wie

beschrieben, aufgezeichnet. Alle Messungen in diesem Versuchsschnitt wurden bei den in 3.9.2.1. beschriebenen 4 Temperaturstufen durchgeführt.

3.9.2.3. Einfluß der Tiefgefrierkonservierung

Insgesamt wurden 9 Ejakulate untersucht (je 3 Ejakulate von 3 Bullen). Die Ejakulate wurden mit dem Tris-Tiefgefrier-Verdünnern (PAUFLER 1974) ohne Glyzerinzusatz ca. 1:9 vorverdünnt. Ein Teil davon wurde mit dem gleichen Verdünnern auf die für die Messung notwendige Dichte von ca. 50000 Spermien/mm³ nachverdünnt. Bei + 38°C wurden jeweils 6 Proben à 10 Gesichtsfelder aufgezeichnet. Der andere Teil des verdünnten Ejakulates wurde, falls notwendig, bis auf ca. 100000 Spermien/mm³ weiter verdünnt. Dann wurde der glyzerinhaltige Verdünnern (11,6 % Glyzerin) im Verhältnis 1:1 beigemischt, so daß eine Glyzerinendkonzentration von 5,8 % gegeben war. Das verdünnte Sperma wurde nun in Pailletten von 0,5 ml Inhalt abgefüllt, diese wurden mit PVC-Puder verschlossen und in einem Wasserbad im Kühlschrank auf + 5°C abgekühlt. Nach einer Adaptionszeit von 4 Stunden wurden die Pailletten im Stickstoffdampf eingefroren und ca. 1 Woche bei - 196°C gelagert. Zur Auswertung wurde 1 Paillette 15 Sekunden bei + 38°C im Wasserbad aufgetaut und von 1 Probe 10 Gesichtsfelder bei + 38°C Meßtemperatur aufgezeichnet. Für jede untersuchte Spermaprobe (insgesamt 6 pro Ejakulat) wurde je eine Paillette frisch aufgetaut.

3.9.3. Einfluß verschiedener pharmakologischer Substanzen auf Motilität und Geschwindigkeit

Um einen eventuellen motilitätssteigernden Effekt dieser Substanzen im Modell besser darstellen zu können, wurde bei der Spermagewinnung der sexuellen Stimulierung der Bullen keine besondere Bedeutung geschenkt. Desgleichen wurde vorher eine Deck-

pause von mindestens 14 Tagen eingehalten. Dies geschah in der Absicht, Ejakulate zu gewinnen, die nicht unbedingt optimale Spermaparameter, vor allem bezüglich der Motilität, aufwiesen.

3.9.3.1. Kallikrein

Untersuchungen über die Wirkung von Kallikrein auf Motilität und Geschwindigkeit von Humanspermien in vitro wurden in einigen Fällen schon mit sog. objektiven Verfahren durchgeführt (STFINER et al. 1978, SATO 1980, MAKLER 1980a). Es liegen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor. So konnten MAKLER et al. (1978) im Gegensatz zu STEINER et al. (1978) und SATO (1980) keinen positiven Effekt des Kallikreins auf die Motilität nachweisen. Bei den folgenden eigenen Versuchen richteten sich die Methodik und die Dosierung nach LEIDL et al. (1975), die den Effekt von Kallikrein auf Bullenspermien u.a. mit Hilfe subjektiver Motilitätsschätzungen untersuchten.

Es wurde je ein Ejakulat von 3 Bullen verwendet. Zu 2 ml des Spermas wurden 20 ml CUE-Tris-Verdünner gegeben. Der verdünnte Samen wurde 6 Minuten lang bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und das Sediment mit dem gleichen Verdünner auf die Meßdichte von ca. 50000 Spermien/mm³ resuspendiert. Es wurden 4 verschiedene Ansätze à 2 ml hergestellt: Ansatz 1 blieb unverändert und diente als Kontrolle. Ansatz 2 wurde mit 100 I.E. Kallikrein, gelöst in 0,1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung und 0,04 ml humanem Blutserum versetzt. Verwendet wurde hochgereinigtes, lyophilisiertes Kallikrein mit 1030 I.E. Kallikrein/mg (Fa. Bayer). Ansatz 3 enthielt nur 0,04 ml humanes Blutserum und der 4. Ansatz 0,04 ml Serum + 10 I.E. Kallikrein (gelöst in 0,01 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung). Von jedem Ansatz wurden 6 Proben à 10 Gesichtsfelder ausgewertet. Von Ansatz 2 (100 I.E. Kallikrein) wurden nach 2 Stunden Lagerung bei + 20°C noch einmal 2 Proben à 10 Gesichtsfelder aufgezeichnet.

3.9.3.2. Koffein

Koffein stimuliert die Motilität und die Geschwindigkeit von Bullenspermien (GARBERS et al. 1971). An Humansperma konnten dies SCHILL (1975) mit Hilfe der Motilitätsschätzung, STEINER et al. (1978) mit der Lasertechnik und LEVIN et al. (1980) mit der Photometrie ebenfalls nachweisen. Dagegen konnten sowohl MAKLER et al. (1980a) als auch SERRES et al. (1982) mit der Hochfrequenzkinematographie keinen signifikanten Einfluß von Koffein erkennen.

Der Einfluß von Koffein wurde an je einem Ejakulat von 3 Bullen untersucht. Der Versuch wurde nach der Split-sample-Methode angesetzt. Die Kontrollprobe wurde mit dem CUE-Tris-Verdünnern auf die für die Messung erforderliche Dichte eingestellt. Die Versuchsprobe wurde in gleicher Weise verdünnt, jedoch enthielt der Verdünnern 10 mM/l Koffein (Sigma, München).

Pro Ejakulat wurden 6 Proben à 10 Gesichtsfelder ausgewertet.

3.9.3.3. Epinephrin

BAVISTER et al. (1979) stellten eine Verbesserung der Motilität von Hamsterspermien durch Katecholamine fest. BALL et al. (1983) wiesen auf einen positiven Einfluß auf die In vitro-Fertilisation beim Rind hin. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob dieser Effekt eventuell durch eine Erhöhung der Motilität und/oder der Geschwindigkeit zu erklären ist. Es wurden 3 Ejakulate von 3 Bullen untersucht.

Zunächst wurden 2 ml Sperma, wie in 3.9.3.1. beschrieben, gewaschen. Nach dem Resuspendieren und Verdünnen wurden 4 Portionen à 2 ml angesetzt, und zwar eine nur mit Verdünnern und eine zweite zusätzlich mit Epinephrin in einer Endkonzentration von 1 μ Mol/l (LEIBFRIED und BAVISTER 1982). Das Epinephrin war in einer Stammlösung (LEIBFRIED und BAVISTER 1982) in einer Konzentration von 25 μ M/l gelöst. Die Stammlösung enthielt 500 μ M D-Penicillamin,

500 μ M Natrium-Metabisulfit, 3 mM Natrium-Laktat und 9,21 g/l NaCl, gelöst in Aqua dest. (alle Chemikalien von Sigma, München). Ein weiterer Ansatz enthielt die 10-fache Epinephrinkonzentration und die vierte Portion nur das verdünnte Sperma sowie die gleiche Menge Stammlösung wie die 2. und 3. Probe, ohne Epinephrin.

Pro Ejakulat wurden wieder 6 Proben à 10 Gesichtsfelder auf Videoband genommen.

3.10. Statistische Methoden

Für die Berechnungen der Spermengeschwindigkeit wurde aus den Werten von jeweils 5 Spermien pro Gesichtsfeld ein Durchschnittswert ermittelt. Bei 300 ausgewerteten Spermien pro Ejakulat wurden somit 60 Durchschnittswerte gebildet und den statistischen Berechnungen zugrunde gelegt. Für die Motilität wurde die Zahl der motilen Spermien innerhalb einer 5er-Gruppe als Basiswert benutzt. Erst nach der Berechnung der statistischen Parameter wurden die so erhaltenen Werte in Prozentangaben umgerechnet.

Die Versuche wurden mittels einer Varianzanalyse auf signifikante Abweichungen überprüft. Zur Absicherung einzelner Differenzen wurden der t-Test sowie der Scheffé-Test verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen zur Meßgenauigkeit

In 10 Ejakulaten eines Bullen ergaben sich Durchschnittswerte von $92,3 \pm 10,0$ $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Tab. 1) für die Spermengeschwindigkeit und $84 \pm 15,3$ % für die Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien; $\bar{x} \pm s$; Tab. 2). Die minimalen bzw. maximalen Werte für die Geschwindigkeit lagen bei 80 bzw. 105 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ und für die Motilität bei 79 bzw. 87 %. Mittels der Varianzanalyse konnten signifikante Abweichungen zwischen den Einzelejakulaten sowohl für die Motilität als auch für die Geschwindigkeit nachgewiesen werden (jeweils $P \leq 0,01$).

Tab. 1: Spermengeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) in 10 Ejakulaten eines Bullen; pro Ejakulat wurden 12 Proben à 10 Gesichtsfelder mit je 5 Spermien ausgewertet

Ejakulat-Nr.	Proben-Nr. (Mittelwerte aus 10 Gesichtsfeldern)												Gesamt n=120 $\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	89	84	86	92	85	86	88	87	80	97	87	102	$89 \pm 8,8$
2	95	98	94	99	92	85	86	90	82	87	92	95	$91 \pm 7,6$
3	91	86	88	90	87	86	91	84	87	86	94	90	$88 \pm 7,2$
4	74	91	81	79	88	72	78	84	82	79	78	77	$80 \pm 7,0$
5	91	103	94	101	95	103	91	104	96	93	98	92	$97 \pm 8,1$
6	91	96	95	95	92	97	88	91	89	87	90	93	$92 \pm 6,8$
7	79	83	89	88	87	86	87	88	85	87	90	86	$86 \pm 6,6$
8	108	107	107	107	103	106	106	103	100	103	104	100	$105 \pm 8,1$
9	94	97	100	95	95	95	94	95	93	96	92	97	$95 \pm 6,7$
10	100	99	101	100	100	95	103	102	104	102	103	99	$101 \pm 7,0$

Tab. 2: Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) in 10 Ejakulaten eines Bullen; pro Ejakulat wurden 12 Proben à 10 Gesichtsfelder mit je 5 Spermien ausgewertet

Ejakulat-Nr.	Proben-Nr. (Mittelwerte aus 10 Gesichtsfeldern)												Gesamt n=120 $\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	82	88	84	86	82	86	82	82	88	86	90	92	86 $\pm$ 13,8
2	76	86	80	74	80	74	84	72	80	82	90	72	80 $\pm$ 15,2
3	82	86	88	92	88	90	88	86	90	80	92	86	87 $\pm$ 12,1
4	76	76	80	86	86	76	86	68	80	84	86	84	81 $\pm$ 17,6
5	90	86	84	84	86	76	88	92	86	82	86	88	86 $\pm$ 16,0
6	86	84	78	84	84	80	76	88	82	82	84	80	82 $\pm$ 13,8
7	90	86	88	80	90	90	84	94	90	88	84	86	87 $\pm$ 15,1
8	82	90	88	88	88	92	86	86	92	88	88	78	87 $\pm$ 14,4
9	88	86	88	92	94	86	86	82	80	80	84	90	86 $\pm$ 14,4
10	82	74	78	84	82	82	70	84	82	78	78	78	79 $\pm$ 17,0

Pro Ejakulat wurden von 12 Proben (= Kammerfüllungen) je 10 Gesichtsfelder mit je 5 Spermien beurteilt. Die Werte der einzelnen Proben variierten bei der Geschwindigkeit (Tab. 1) maximal im ersten Ejakulat (80 bis 102 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und minimal im 8. und 9. Ejakulat (100 bis 108 bzw. 92 bis 100 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$). Die Varianzanalyse ergab in 6 von 10 Ejakulaten signifikante Differenzen ($P \leq 0,05$) zwischen den ausgewerteten Proben. Die Motilität in den einzelnen Proben (Tab. 2) wies im ersten Ejakulat die geringste (82 bis 92 %) und im zweiten Ejakulat die höchste Schwankungsbreite auf (72 bis 90 %). Innerhalb eines Ejakulates traten in keinem Fall signifikante Unterschiede zwischen den Proben auf.

Bezogen auf die in diesem Versuchsabschnitt ausgewerteten 1200 Gesichtsfelder wurde zwischen den Parametern Motilität und Geschwindigkeit ein Korrelationskoeffizient von $r = +0,012$ ($P = 0,339$) ermittelt, d.h., daß sich diese beiden Eigenschaften unabhängig voneinander verhielten.

Die im zweiten Versuchsabschnitt ausgewerteten 7 Ejakulate von 7 verschiedenen Bullen zeigten mittels der Varianzanalyse sowohl in der Motilität als auch in der Geschwindigkeit signifikante Differenzen ($P \leq 0,05$; Tab. 3 und 4). Die Durchschnittswerte der Geschwindigkeit schwankten zwischen 69 und 96 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Tab. 3), die der Motilität zwischen 56 und 80% (Tab. 4). Während bei dem Parameter Geschwindigkeit in allen Ejakulaten signifikante Differenzen zwischen einzelnen Proben auftraten, war dies bei der Motilität nur in einem Ejakulat der Fall.

Tab. 3: Spermengeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) in je einem Ejakulat von 7 Bullen; pro Ejakulat wurden 12 Proben à 10 Gesichtsfelder mit je 5 Spermien ausgewertet

Bulle Nr.	Proben-Nr. (Mittelwerte aus 10 Gesichtsfeldern)												Gesamt $n=120$ $\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1*	78	91	83	77	72	87	77	74	79	83	81	-	$80 \pm 7,6$
2	70	93	76	80	85	83	78	73	69	74	71	77	$77 \pm 8,3$
3	78	72	72	69	63	66	65	74	67	62	67	69	$69 \pm 7,6$
4	76	82	83	81	83	84	88	78	80	77	83	82	$81 \pm 7,0$
5	65	80	71	62	63	64	66	64	68	65	64	66	$66 \pm 7,0$
6	87	85	89	95	86	97	95	82	94	89	87	88	$90 \pm 7,9$
7	102	99	101	97	94	98	99	98	94	90	92	87	$96 \pm 8,1$

* In diesem Ejakulat wurden nur 11 Proben à 10 Gesichtsfelder ausgewertet

Tab. 4: Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) in je einem Ejakulat von 7 Bullen; pro Ejakulat wurden 12 Proben à 10 Gesichtsfelder mit je 5 Spermien ausgewertet

Ejakulat-Nr.	Proben-Nr. (Mittelwerte aus 10 Gesichtsfeldern)												Gesamt n=120 $\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1*	78	80	78	86	78	80	76	68	66	80	72	-	72 $\pm$ 18
2	70	64	76	74	78	78	60	64	66	72	78	78	72 $\pm$ 20
3	76	70	76	72	74	54	68	66	56	72	70	64	68 $\pm$ 18
4	66	74	68	74	70	80	72	76	80	66	84	74	74 $\pm$ 16
5	56	68	64	56	58	64	58	64	70	58	62	64	62 $\pm$ 18
6	62	56	60	54	58	46	54	60	52	64	58	52	56 $\pm$ 16
7	86	66	76	86	80	78	86	74	80	88	78	84	80 $\pm$ 16

* In diesem Ejakulat wurden nur 11 Proben à 10 Gesichtsfelder ausgewertet

Basierend auf den Wertepaaren aus 830 Gesichtsfeldern wurde zwischen Motilität und Geschwindigkeit ein Korrelationskoeffizient von $r = +0,12$ ($P \leq 0,01$) ermittelt.

Bezogen auf die Standardabweichung der für die 10 Ejakulate eines Bullen ermittelten Durchschnittswerte (siehe oben) ergeben sich folgende von der Zahl der Beobachtungen und der Irrtumswahrscheinlichkeit abhängige Vertrauensbereiche, die die Meßgenauigkeit dieser Methode verdeutlichen. Für $n = 10$ (50 beurteilte Spermien in 10 Gesichtsfeldern einer Kammerfüllung) ergab sich für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$ bei der Geschwindigkeit ein Vertrauensbereich von $\pm 25,7\%$ bzw. $\pm 10,87\%$ sowie bei der Motilität von $\pm 12,86\%$ bzw. $\pm 18,27\%$. Für $n = 60$ (6 Proben à 10 Gesichtsfelder mit insgesamt 300 beurteil-

ten Spermien) lauten die entsprechenden Zahlen für die Geschwindigkeit $\pm 2,80$ % bzw. $\pm 3,72$ % und für die Motilität $\pm 4,70$ % bzw. $6,25$ %. Für $n = 120$ (12 Proben à 10 Gesichtsfelder) schließlich wurden Vertrauensbereiche von $\pm 1,96$ % bzw. $2,59$ % für die Geschwindigkeit und $\pm 3,30$ % bzw. $\pm 4,36$ % für die Motilität ermittelt. Als Kompromiß zwischen Auswertungsaufwand und Meßgenauigkeit wurde daher in den folgenden Versuchen mit einer n -Zahl von 60, das heißt also 300 ausgewerteten Spermien, pro Spermaprobe gearbeitet.

4.2. Auswirkungen verschiedener Meßtemperaturen bzw. verschiedener Konservierungsarten auf Motilität und Geschwindigkeit

4.2.1. Einfluß der Temperatur während der Messung

Die Temperatur ist bekanntermaßen für die Motilität und Geschwindigkeit der Spermien von großer Bedeutung. In Abb. 1 ist der Einfluß der Meßtemperatur auf diese beiden Parameter am Beispiel eines Bullenejakulates dargestellt. Während die Geschwindigkeit der Spermien im Bereich von $21 - 45^{\circ}\text{C}$ nahezu linear anstieg, erhöhte sich die Motilität im Bereich zwischen 25 und 27°C sehr rasch, um dann bis über 40°C nahezu konstant zu bleiben. Bei 45°C kam es schließlich zu einem abrupten Abfall der Motilität. Die wenigen noch vorwärtsbeweglichen Spermien wiesen jedoch die höchste Geschwindigkeit auf.

Die Überprüfung der Beziehung zwischen Temperatur und Geschwindigkeit ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = +0,94$ ($P \leq 0,01$), zwischen Temperatur und Motilität von $r = +0,38$ ($P \leq 0,01$) sowie zwischen Motilität und Geschwindigkeit von $r = +0,41$ ($P \leq 0,01$).

Die auf Grund dieser Erkenntnisse durchgeführten Untersuchungen an je 3 Ejakulaten von 3 Bullen mit den Meßtemperaturen 20 , 26 , 32 und 38°C bestätigten die im Vorversuch gewonnenen Ergebnisse (Tab. 5 und 6). Die Durchschnittsgeschwindigkeiten in den 9

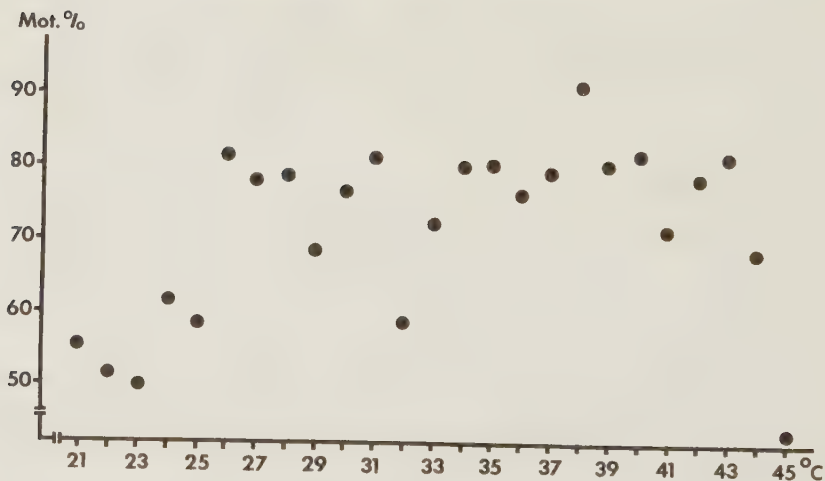
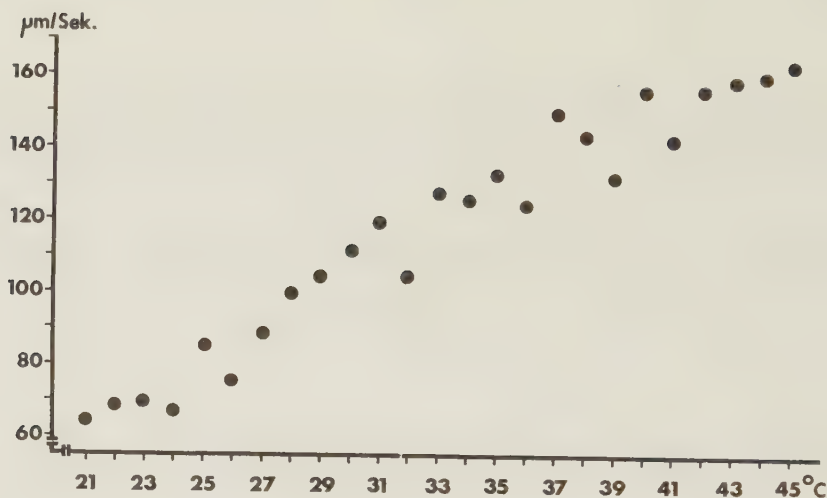


Abb. 1: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/Sek.}$) bzw. Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien in Abhängigkeit von der Meßtemperatur (21 - 45 $^{\circ}\text{C}$; Jeder Punkt beruht auf Messungen an 50 Spermien)

Tab. 5: Spermengeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) in je 3 Ejakulaten von 3 Bullen bei Meßtemperaturen von 20°C, 26°C, 32°C und 38°C; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet

Temperatur °C	Ejakulat-Nr. ($\bar{x}$; n = 60)									Durchschnitt		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	aus 9 Ejakulaten	$\bar{x}$	$\pm$ s
		Bulle A			Bulle B			Bulle C				
20	57	37	37	44	38	48	31	43	-	42 ^a	$\pm$	8,9
26	75	51	54	66	48	63	43	58	50	56 ^b	$\pm$	10,8
32	95	75	60	83	67	83	62	83	81	77 ^c	$\pm$	13,5
38	122	101	93	109	98	95	93	97	115	102 ^d	$\pm$	15,0

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix (a, b, c, d) unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

Tab. 6: Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) in je 3 Ejakulaten von 3 Bullen bei Meßtemperaturen von 20°C, 26°C, 32°C und 38°C; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet

Temperatur °C	Ejakulat-Nr. ($\bar{x}$; n = 60)									Durchschnitt		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	aus 9 Ejakulaten	$\bar{x}$	$\pm$ s
		Bulle A			Bulle B			Bulle C				
20	34	26	26	34	38	52	34	40	-	36 ^a	$\pm$	22
26	60	72	76	80	76	68	70	80	28	68 ^b	$\pm$	22
32	70	76	78	78	78	70	76	78	68	74 ^c	$\pm$	18
38	74	80	80	82	76	70	76	76	72	76 ^c	$\pm$	18

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

Ejakulaten betrugen bei diesen Meßtemperaturen 42, 56, 77 und 102 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (alle Differenzen $P \leq 0,01$) und wiesen damit einen ähnlich linearen Anstieg wie im vorhergehenden Versuch auf (Tab. 5).

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien stieg, analog der Beobachtung im ersten Versuchsabschnitt, zwischen 20 und 26°C sehr stark an (36 bzw. 68 %; $P \leq 0,01$). Bei 32 sowie 38°C erhöhte sich die Motilität auf 74 bzw. 76 % (Differenz zu den Werten der niedrigeren Temperaturstufen jeweils $P \leq 0,01$). Der Einfluß der Meßtemperatur auf Motilität und Geschwindigkeit ist in Abb. 2 am Beispiel von 3 Ejakulaten eines Bullen graphisch dargestellt.

4.2.2. Einfluß der Flüssigkonservierung

Zur Überprüfung der Auswirkung einer bis zu 72 Stunden dauernden Flüssigkonservierung bei + 5°C auf Motilität und Geschwindigkeit wurden Messungen bei + 20, + 26, + 32 und + 38°C durchgeführt. Das Verhalten beider Parameter war wiederum temperaturabhängig und entsprach weitgehend den Beobachtungen im vorhergehenden Versuch (siehe 4.2.1. und Abb. 3).

Die Geschwindigkeit der Spermien wurde, in allen Temperaturstufen erkennbar, mit fortschreitender Lagerungsdauer deutlich geringer ($P \leq 0,01$; Tab. 7). Nur bei einer Temperatur von 32°C war nach 72 Stunden gegenüber 24 Stunden Lagerung keine Verminderung der Spermigeschwindigkeit festzustellen. Die Motilität (Tab. 8) fiel bei + 20 und + 26°C nach 24 Stunden Lagerung deutlich ab (Differenz zu 0 Stunden jeweils $P \leq 0,01$). Nach 72 Stunden war bei + 20°C sogar ein leichter Anstieg von + 38 auf 45 % zu registrieren (Differenz: $P \leq 0,01$), während bei 26°C der Abfall in etwa linear weiterging. Bei 32 bzw. 38°C konnte jeweils erst nach 72 Stunden Lagerungsdauer ein Absinken der Motilität nachgewiesen werden.

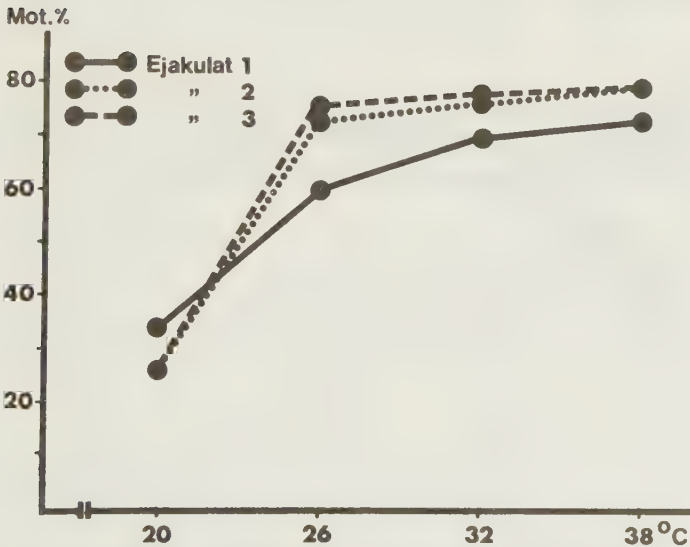
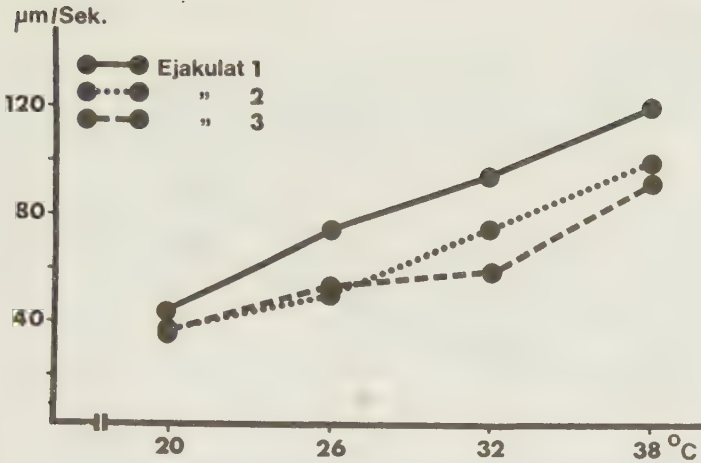


Abb. 2: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/Sek.}$) bzw. Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) bei verschiedenen Meßtemperaturen am Beispiel von 3 Ejakulaten eines Bullen; jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert aus 300 ausgewerteten Spermien

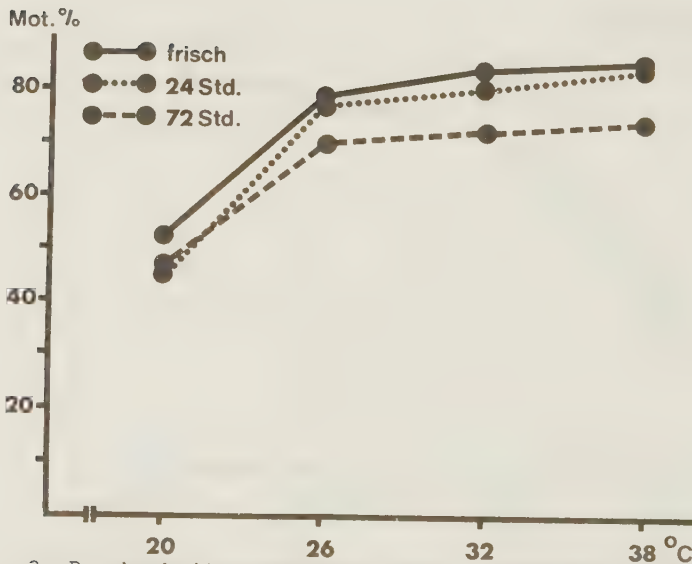
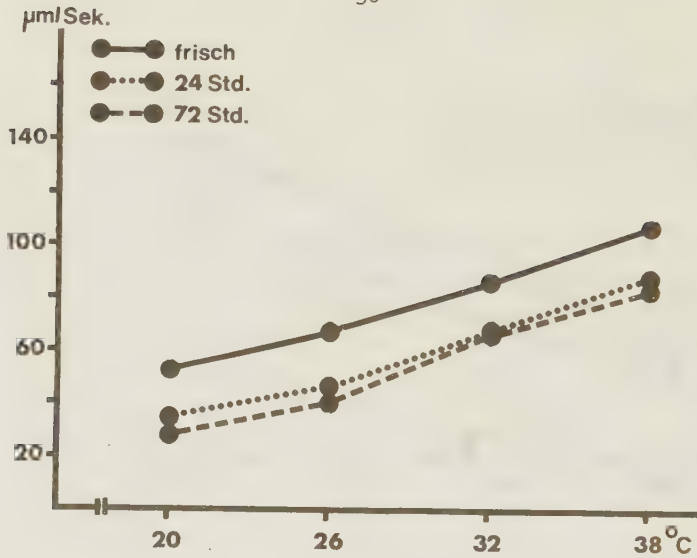


Abb. 3: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/Sek.}$) bzw. Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und der Meßtemperatur am Beispiel eines Ejakulates des Bullen 18; jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert aus 300 ausgewerteten Spermien

Tab. 7: Der Einfluß einer Flüssigkonservierung bis zu 72 Stunden (+ 5°C) auf die Geschwindigkeit (µm/Sek.) von Bullenspermien (Durchschnittswerte aus 3 Ejakulaten; pro Ejakulat wurden jeweils 300 Spermien ausgewertet)

Meßtemperatur	Lagerungsdauer		
	0 Stunden	24 Stunden	72 Stunden
20°C	47 ^a	32 ^b	30 ^c
26°C	64 ^a	43 ^b	38 ^c
32°C	86 ^a	68 ^b	68 ^b
38°C	110 ^a	91 ^b	85 ^c

Werte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

Tab. 8: Der Einfluß einer Flüssigkonservierung bis zu 72 Stunden (+ 5°C) auf die Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (Durchschnittswerte aus 3 Ejakulaten; pro Ejakulat wurden jeweils 300 Spermien ausgewertet)

Meßtemperatur	Lagerungsdauer		
	0 Stunden	24 Stunden	72 Stunden
20°C	50 ^a	38 ^b	45 ^c
26°C	81 ^a	75 ^b	66 ^c
32°C	85 ^a	83 ^a	77 ^b
38°C	86 ^a	85 ^a	78 ^b

Werte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

In Abbildung 3 ist an Hand eines Ejakulates von einem Bullen das charakteristische Verhalten von Motilität und Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer sowie der Meßtemperatur dargestellt.

4.2.3. Einfluß der Tiefgefrierkonservierung

Die Messungen in diesem Versuchsabschnitt wurden bei + 38°C durchgeführt. Die Tiefgefrierkonservierung wirkte sich bei den 9 untersuchten Ejakulaten unterschiedlich aus (Tab. 9). Die Spermengeschwindigkeit war in 4 von 9 Ejakulaten nach dem Auftauen höher, bei den anderen 5 Ejakulaten niedriger als vor dem Einfrieren. Die Motilität war in 2 Ejakulaten nach dem Auftauen besser als vorher, in einem blieb sie unverändert und in 6 Ejakulaten war ein Absinken der Motilität zu verzeichnen. Insgesamt ergaben sich bei der Geschwindigkeit praktisch keine Veränderungen durch den Tiefgefrierprozeß (90 bzw. 89 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$), dagegen fiel die Motilität im Durchschnitt aller 9 Ejakulate von 74 % vor dem Einfrieren auf 62 % in aufgetauten Spermaproben (Differenz $P \leq 0,05$).

4.3. Einfluß verschiedener pharmakologischer Substanzen auf Motilität und Geschwindigkeit

4.3.1. Kallikrein

Wie schon in 3.9.3. erwähnt, wurde bei der Gewinnung der Ejakulate kein besonderer Wert auf eine optimale Spermaqualität gelegt, um den eventuell stimulierenden Einfluß der zu testenden Substanzen besser darstellen zu können. Die Ausgangswerte von nur 79 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Geschwindigkeit) bzw. 52 % (Motilität) sind wahrscheinlich auf diese Maßnahmen zurückzuführen (Tab. 10). Allein die Zugabe von 0,04 ml Humanserum zu verdünntem Bullensperma

Tab. 9: Spermien geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) in je 3 Ejakulaten von 3 Bullen vor und nach der Tiefgefrierkonservierung; es wurden jeweils 300 Spermien ausgewertet

Bulle Nr.	Ejakulat- Nr.	Geschwindigkeit $\mu\text{m}/\text{Sek.}$		Motilität (%)	
		frisch	aufgetaut	frisch	aufgetaut
16	1	89	102	50	66
	2	100	88	76	70
	3	95	87	84	56
18	1	85	101	50	60
	2	89	91	84	52
	3	97	86	84	62
19	1	85	74	60	60
	2	95	79	86	72
	3	88	91	76	56
Gesamt	$\bar{x} \pm s$	$90 \pm 6,4$	$89 \pm 11,4$	$74 \pm 18,0$	$62^* \pm 16,0$

* Die Motilität in TG-Spermaproben unterscheidet sich von der in frischem Sperma signifikant ($P \leq 0,05$; t-Test)

Tab. 10: Der Einfluß von Kallikrein auf die Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und die Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je 1 Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet; $\bar{x} \pm s$)

Bulle Nr.	Kontrollwert	Geschwindigkeit $\mu\text{m}/\text{Sek.}$			
		+ Serum	+ 10 I.E.Kall. + Serum	+ 100 I.E.Kall. + Serum	+ 100 I.E.Kall. ^A + Serum
16	71	108	104	110	111
18	86	111	112	114	119
19	79	122	117	126	121
Gesamt		79 $\pm$ 9,3 ^a	114 $\pm$ 11,3 ^b	112 $\pm$ 11,1 ^b	117 $\pm$ 11,3 ^b
				117 $\pm$ 11,3 ^b	117 $\pm$ 9,4 ^b

Bulle Nr.	Kontrollwert	Motilität %			
		+ Serum	+ 10 I.E.Kall. + Serum	+ 100 I.E.Kall. + Serum	+ 100 I.E.Kall. ^A + Serum
16	54	66	64	70	68
18	52	70	66	68	70
19	48	60	70	62	68
Gesamt		52 $\pm$ 16 ^a	66 $\pm$ 14 ^b	66 $\pm$ 14 ^b	68 $\pm$ 12 ^b
				66 $\pm$ 14 ^b	68 $\pm$ 12 ^b

A = Wert nach 2-stündiger Lagerungsdauer (2 Proben à 50 Spermien)
 Werte der gleichen Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

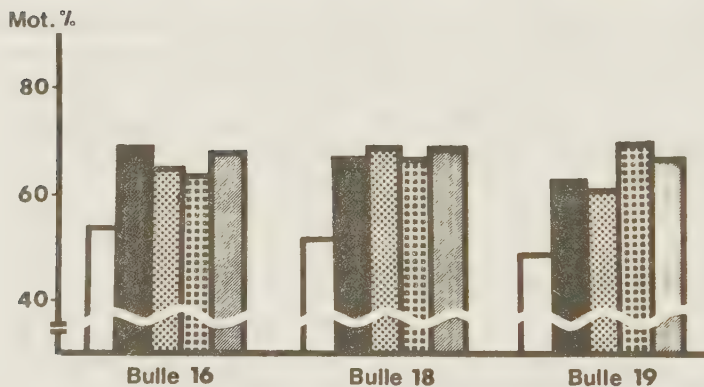
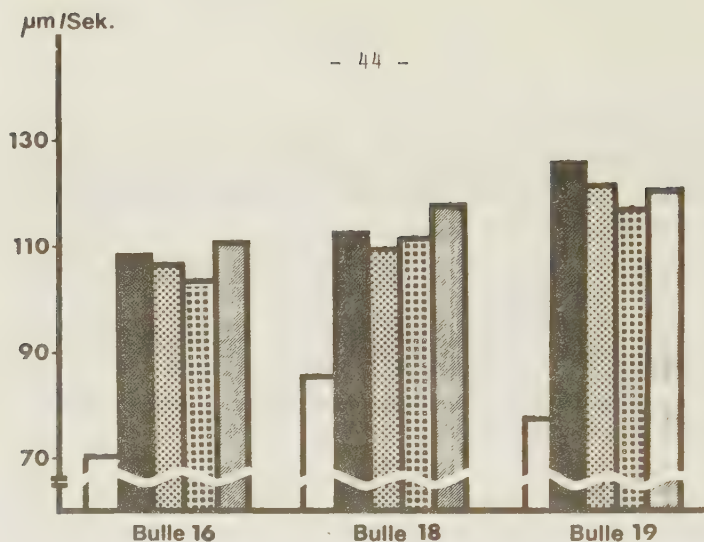
steigerte die Geschwindigkeit auf 114 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ und die Motilität auf 66 % (Differenzen jeweils $P \leq 0,01$). Weder die Zugabe von 10 I.E. noch die von 100 I.E. bewirkten eine darüber hinausgehende Steigerung von Motilität und Geschwindigkeit. Es ist möglich, daß die maximale Stimulierung bereits durch Serum allein ausgelöst wurde und ein eventueller Effekt durch Kallikrein dadurch nicht mehr nachweisbar war. Die Stimulierung der Bewegungsintensität in der Probe mit Serum und 100 I.E. Kallikrein war auch noch 2 Stunden nach der Zugabe nachzuweisen. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Abb. 4 graphisch dargestellt.

4.3.2. Koffein

Die Zugabe von 10 mM Koffein bewirkte in allen 3 untersuchten Ejakulaten eine Steigerung von Motilität und Geschwindigkeit (Tab. 11, Abb. 5). Im Durchschnitt aus allen Ejakulaten stieg die Geschwindigkeit nach Zugabe von Koffein von 75 auf 102 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ und die Motilität von 54 auf 62 % (Differenzen jeweils $P \leq 0,05$).

4.3.3. Epinephrin

Eine Zugabe von 1 μM Epinephrin zu verdünntem Bullensperma führte zu einer deutlichen Steigerung der Geschwindigkeit von 70 auf 78 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ sowie der Motilität von 52 auf 62 % (Differenzen jeweils $P \leq 0,01$). Die alleinige Zugabe der entsprechenden Menge Stammlösung ohne Epinephrin hatte eine fast gleich starke Steigerung zur Folge (Tab. 12, Abb. 6). Wurde die Epinephrinkonzentration auf 10 μM erhöht, war weder bei der Motilität noch bei der Geschwindigkeit ein signifikanter Effekt gegeben.



- Verdünntes Sperma
- Verdünntes Sperma + Serum + 100 I.E. Kallikrein
- Verdünntes Sperma + Serum
- Verdünntes Sperma + Serum + 10 I.E. Kallikrein
- Verdünntes Sperma + Serum + 100 I.E. Kallikrein 2 Std. nach der 1. Messung bestimmt (nur 100 Zellen)

Abb. 4: Der Einfluß von Kallikrein auf Spermengeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je ein Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet)

Tab. 11: Der Einfluß von Koffein auf Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je 1 Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet)

Geschwindigkeit $\mu\text{m}/\text{Sek.}$	Bulle Nr.			Gesamt $\bar{x} \pm s$
	16	18	19	
Ohne Koffein	66	93	67	$75 \pm 13,9$
Mit Koffein	95	112	100	$102 \pm 11,1^a$
Motilität (%)	Bulle Nr.			Gesamt $\bar{x} \pm s$
	16	18	19	
Ohne Koffein	54	54	52	54 ± 16
Mit Koffein	60	60	66	62 ± 14^a

^a Proben unterscheiden sich signifikant vom Ausgangswert
 $P \leq 0,05$; t-Test)

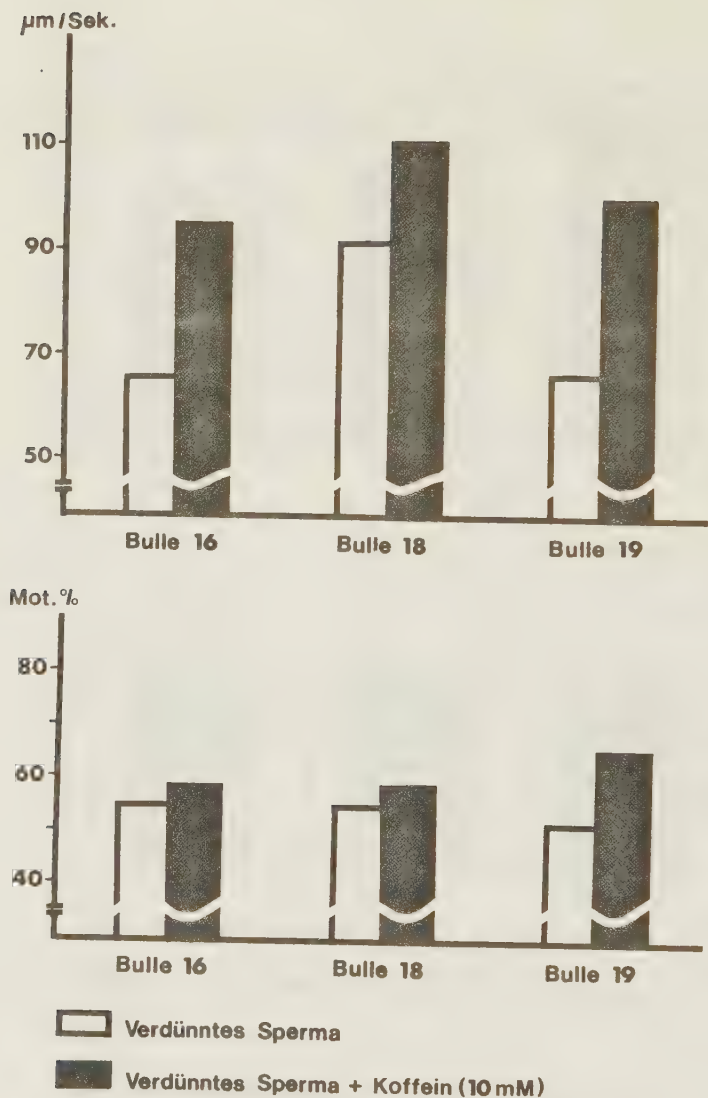


Abb. 5: Der Einfluß von Koffein auf Geschwindigkeit ($\mu\text{m/Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je 1 Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet)

Tab. 12: Der Einfluß von Epinephrin auf Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je 1 Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet)

Geschwindigkeit $\mu\text{m}/\text{Sek.}$	16	Bulle Nr. 18	19	Gesamt $\bar{x} \pm s$
Ausgangswert	70	78	62	$70 \pm 8,3^a$
+ Epinephrin (1 μm)	80	87	68	$78 \pm 9,4^b$
+ Epinephrin (10 μm)	-	75	65	$70 \pm 7,3^c$
+ Stammlösung	72	87	68	$75 \pm 9,6^d$
Motilität (%)	16	Bulle Nr. 18	19	Gesamt $\bar{x} \pm s$
Ausgangswert	54	50	52	52 ± 16^a
+ Epinephrin (1 μm)	62	64	62	62 ± 14^b
+ Epinephrin (10 μm)	-	56	54	56 ± 16^c
+ Stammlösung	52	60	62	58 ± 16^d

Differenzen Geschw.: a-b, a-d, c-b, c-d ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)
Differenzen Motilität: a-b, a-d, b-c ($P \leq 0,01$; Scheffé-Test)

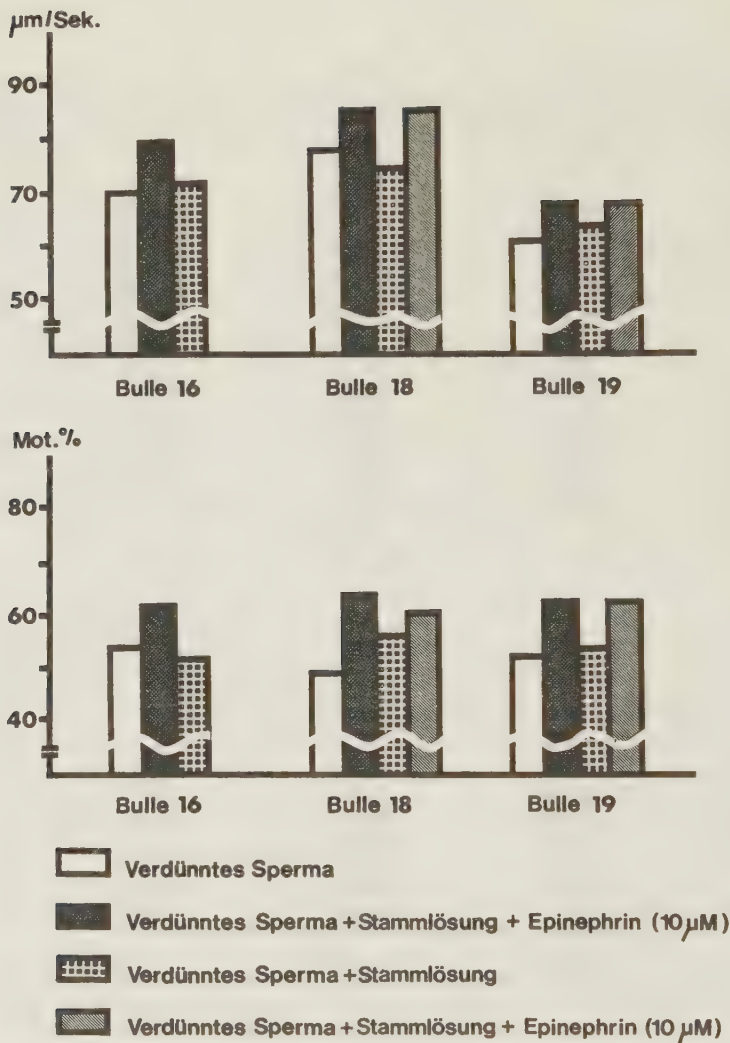


Abb. 6: Der Einfluß von Epinephrin auf Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) und Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien (je 1 Ejakulat von 3 Bullen; pro Ejakulat wurden 300 Spermien ausgewertet)

5. DISKUSSION

Eine Methode zur Bestimmung der Bewegungsintensität und Bewegungsform von Spermien sollte folgenden Forderungen gerecht werden:

- a) Die Methode sollte zumindest Aussagen über den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien (= Motilität) und die Durchschnittsgeschwindigkeit motiler Spermien erlauben. Eventuell wären auch Angaben über andere, vor allem die sog. pathologischen Bewegungsformen sowie über die Geschwindigkeitsverteilung bei den motilen Spermien erwünscht.
- b) Ein subjektives Urteil von Seiten des Untersuchers sollte bei der eigentlichen Beurteilung der Parameter auf keinen Fall notwendig sein. Ideal wäre es, wenn auch die Probenauswahl bzw. die Auswahl der zu beurteilenden Spermien unabhängig von der Entscheidung des Untersuchers wären.
- c) Die Meßanordnung soll so sein, daß die Spermaprobe in toto, d.h. ohne weitere Manipulation, gemessen werden kann. Dabei sollte entweder die Vitalität der Spermien nicht beeinträchtigt werden oder das für die Untersuchung nötige Volumen im Verhältnis zur Gesamtprobe sehr gering sein.
- d) Die Meßgenauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit muß die subjektive Schätzung übertreffen, die sich z.B. bei der Beurteilung des Spermas für die künstliche Besamung durchaus bewährte, aber in der Regel nicht ausreicht, geringe Einflüsse von Pharmaka u.ä. darzustellen.
- e) Letztendlich sollten die Messung und Auswertung einer Spermaprobe nur kurze Zeit beanspruchen, um z.B. im Routinebetrieb einer Besamungsstation jedes anfallende Ejakulat untersuchen zu können.

Beurteilt man anhand dieser Kriterien die in der Literatur erwähnten Methoden zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung, so wird klar, daß ein ideales Verfahren noch nicht bekannt ist. Theoretisch könnte die Laser-Doppler-Spektroskopie zur indirekten

Bewegungsmessungen alle geforderten Ansprüche erfüllen. Mit dieser Methode könnte u.a. neben der Motilität und der Durchschnittsgeschwindigkeit auch die Geschwindigkeitsverteilung der motilen Spermien und die Geschwindigkeit von pathologischen Bewegungsformen ermittelt werden (JOUANNET et al. 1977; STEINER et al. 1978). Weiterhin erlaubt dieses Verfahren auch Verlaufsuntersuchungen. Eine Messung erfordert außerdem nur kurze Zeit. Messung und Auswertung sind praktisch unabhängig vom Untersucher. Diese Methode wurde bisher jedoch nur im Modell vorgestellt und überprüft. Eine Bestätigung an umfangreicherem Material, z.B. im Routinebetrieb einer Besamungsstation, und damit auch ein Nachweis für die biologische Wertigkeit der meßbaren Größen steht noch aus. Als Nachteil ist die kostspielige Apparatur der Lasertechnik zu nennen, die einer breiteren Anwendung im Wege steht.

Im Gegensatz zu der oben genannten indirekten Meßmethode haben die über eine direkte Auswertung an Einzelspermien arbeitenden Verfahren vereinzelt bereits Eingang in die Praxis gefunden (OVERSTREET et al. 1979, MAKLER 1980a, KATZ und OVERSTREET 1981). Ausschlaggebend dafür sind wahrscheinlich die nicht sehr kostspielige Ausrüstung und vor allem die verlässliche Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. Man kann den Weg eines motilen Spermiums direkt verfolgen und messen, wobei zusätzlich der subjektive Eindruck bei der Beobachtung als Korrekturmöglichkeit zur Verfügung steht. Dadurch ist jedoch auch die Gefahr einer unerwünschten Selektion gegeben. Die weiteren Nachteile derartiger Methoden liegen ebenfalls auf der Hand. An erster Stelle ist der zeitraubende und personalintensive Auswertungsmodus zu nennen. Zweitens muß die Spermaprobe in eine Meßkammer gefüllt werden, was mit motilitätshemmenden Einwirkungen verbunden sein kann. Die photographischen bzw. kinematographischen Meßanordnungen haben zudem den Nachteil, daß der Film zwischen Aufnahme und Auswertung entwickelt werden muß und deshalb nicht sofort zur Verfügung steht.

Der Wegfall des Entwicklungsprozesses stellt einen wesentlichen Vorteil der Videomikrographie gegenüber der phototechnischen

Auswertung dar. Diese Methode profitiert damit in vielen Belangen von dem hohen Stand der Videoaufzeichnung und -wiedergabe. Deshalb wurde dieses Verfahren für die eigenen Untersuchungen ausgewählt.

Faßt man die während der Versuchsdurchführung gesammelten Erfahrungen zusammen, so liegt die Problematik der Methode vor allem in der Funktion und Handhabung der Meßkammer. Da für die Messungen in der Kammer zumindest bei Bullensperma eine Verdünnung notwendig ist, ist bereits hier die erste Einschränkung zu machen. Ein Einfluß der Verdünnung bzw. des Verdünners selbst auf die Motilität von Spermien ist bekannt. Theoretisch müssen daher die gemessenen Werte nicht mit den ursprünglichen Verhältnissen im Ejakulat übereinstimmen. Die von MAKLER (1980b) entwickelte Kammer mit nur 10 µm Tiefe bietet zwar beste Voraussetzungen für die Beurteilung der Horizontalbewegung der Spermien, andererseits ist aber die Gefahr groß, artifizielle Veränderungen zu erzeugen. Auch bei großer Sorgfalt von Seiten des Untersuchers treten immer wieder Artefakte wie Luftblasen oder Staubeilchen in der Kammer auf, die die Motilität der Spermien insgesamt oder in bestimmten Bereichen beeinträchtigen. Deshalb kommt hier der subjektiven Beurteilung der Motilität im Nativsperma, nach der Verdünnung sowie nach der Kammerfüllung große Bedeutung zu.

Ein weiterer, wichtiger Punkt ist die Äquilibration der Spermien an die Kammertemperatur. Je höher die Temperatur in der Kammer war, desto länger dauerte es, bis sich ein einheitliches Bild der Motilität in verschiedenen Gesichtsfeldern einstellte. Kurz nach der Kammerfüllung wurden häufig Zickzackbewegungen und Kreisschwimmer beobachtet, die nach längstens 5 - 6 Minuten in eine einheitliche und gleichmäßigere Vorwärtsbewegung übergingen. Die Anpassungszeit war auch zwischen Ejakulaten eines Bullen verschieden und muß daher wahrscheinlich jeweils im Einzelfall subjektiv beurteilt werden. Damit bleibt bei diesem sog. "objektiven" Meßverfahren ein gewisses Maß an Subjektivität erhalten, das nicht zu eliminieren ist.

Der Auswertungsmodus der Videomikrographie ist ebenfalls nicht frei von subjektiven Einflüssen. Die Auswahl der Spermien war zwar durch die V-förmige Linie auf dem Monitor vorgegeben, trotzdem ist damit der Entscheidungsspielraum des Untersuchers nicht völlig ausgeschaltet. Aus verständlichen Gründen neigt man dazu, im Zweifelsfall eher vorwärtsbewegliche Spermien mit möglichst gerader Schwimmrichtung auszuwählen, gegenüber Spermien mit davon abweichendem Bewegungsverlauf.

Trotz dieser vorher genannten Einschränkungen konnte, abhängig von der n-Zahl, eine sehr gute bis ausreichende Meßgenauigkeit erzielt werden. Die Zahl der erforderlichen Beobachtungen ist abhängig vom Ziel der jeweiligen Untersuchung und vom Arbeitsaufwand, der damit verbunden ist. In den eigenen Versuchen wurden, wo es um den Vergleich verschiedener Einflüsse auf Bullenspermien ging (Temperatur, Konservierungsart, Testsubstanz), jeweils 300 Spermien für beide Parameter ausgewertet. Der zeitliche Aufwand dafür betrug insgesamt ca. 1 Stunde. Berücksichtigt man weiterhin, daß die Auswertung am Monitor eine sehr anstrengende Tätigkeit darstellt, dürfte mit dieser Beobachtungszahl eine Obergrenze erreicht sein, die noch sinnvoll ist. Eine weitere Steigerung der n-Zahl bewirkt tatsächlich auch nur mehr eine relativ geringe Verbesserung der Meßgenauigkeit. Für einen Einsatz im Routinebetrieb muß wahrscheinlich wegen des erforderlichen Zeitaufwandes eine weitaus geringere n-Zahl gewählt werden. Die in diesen Versuchen festgestellte Meßgenauigkeit für eine Auswertung an 50 Spermien dürfte für viele Zwecke in der Praxis ausreichend sein. Auch KATZ und OVERSTREET (1981) hatten in ihren Untersuchungen an Human- und Bullensperma mit der Videomikrographie jeweils nur 50 Spermien ausgewertet.

Die in diesen Versuchen ermittelten Durchschnittswerte von Geschwindigkeit und Motilität von Bullenspermien bei + 38°C (s. Tab. 1, 2, 3 und 4) liegen innerhalb der in der Literatur erwähnten Schwankungsbreite (LUSTIG und LINDAHL 1970, AMANN und HAMMERSTEDT 1980, KATZ und OVERSTREET 1981). Eine Änderung der Meßtemperatur hatte im Bereich von 20 bis 38°C signifikante Auswirkung

gen auf beide Parameter. Während jedoch die Geschwindigkeit mit zunehmender Temperatur gleichmäßig anstieg, erhöhte sich die Motilität bereits im Bereich zwischen 25 und 27°C auf nahezu maximale Werte. Ob dieses unterschiedliche Verhalten von Motilität und Geschwindigkeit eine biologische Bedeutung hat, ist auf Grund dieser Untersuchungen nicht zu klären. Es ist anzunehmen, daß die Geschwindigkeit der Spermien mit dem Stoffwechsel der Spermien in enger Beziehung steht und dieser wieder direkt von der Umgebungstemperatur abhängt. Die Motilität, d.h. der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, könnte dagegen bei einer gewissen Grenztemperatur gleichsam an- bzw. ausgeschaltet und so im Sinne einer Schutzfunktion gesteuert werden. Bei einer Meßtemperatur von 38°C konnte in den 10 Ejakulaten eines Bullen sowie in den 7 Ejakulaten von verschiedenen Bullen keine Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Motilität nachgewiesen werden. Allerdings muß einschränkend hinzugefügt werden, daß für die Messungen ausschließlich Bullenejakulate verwendet wurden, die eine nach üblichen andrologischen Kriterien normale Motilität aufwiesen. In den Versuchen über die Auswirkungen einer Flüssigkonservierung auf Motilität und Geschwindigkeit war, zumindest nach 72 Stunden Lagerungsdauer, sowohl ein Abfall der Motilität, als auch ein Abfall der Geschwindigkeit der Spermien festzustellen. Dagegen hatte eine Tiefgefrierkonservierung unterschiedliche Auswirkungen auf diese Parameter. Während die Spermengeschwindigkeit nahezu gleich blieb, war der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien deutlich niedriger (74 bzw. 62 %, $P \leq 0,05$). Wahrscheinlich beruht dieser Effekt darauf, daß durch die Noxe des Einfriervorgangs ein gewisser Anteil von Spermien abgetötet wird und dadurch die Motilität geringer wird. Der Stoffwechsel der überlebenden Spermien und damit ihre Bewegungsintensität wird aber offensichtlich nicht beeinträchtigt. Allerdings waren in den untersuchten 9 Ejakulaten der Einfluß der Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Geschwindigkeit nicht einheitlich.

Die Untersuchungen zur Wirkung von Kallikrein, Koffein und Epinephrin auf die Bewegungsintensität von Bullenspermien hatten

nicht das unmittelbare Ziel einer Abklärung dieser Effekte. Vielmehr ging es darum, an einem weiteren Modell die Möglichkeiten der Videomikrographie, Motilitäts- und Geschwindigkeitsveränderungen zu objektivieren und darzustellen. Die alleinige Zugabe von Humanserum zu verdünntem Bullensperma bewirkte einen deutlichen Anstieg von Motilität und Geschwindigkeit (Differenz jeweils $P \leq 0,01$, s. Tab. 10). Humanserum war zugegeben worden, da Kallikrein die im Serum enthaltenen Kininogene in Kinine spaltet, die letztendlich den Effekt auslösen sollen. Eine Zugabe von 10 I.E. bzw. 100 I.E. Kallikrein konnte keine weitere Stimulierung der Spermien hervorrufen (Tab. 10, Abb. 4). Der Unterschied in der Durchschnittsgeschwindigkeit vor und nach Zugabe von Serum betrug $35 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ ($79 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ - $114 \mu\text{m}/\text{Sek.}$), der Unterschied in der Motilität betrug 16 % (52 % - 66 %). In beiden Fällen waren diese Differenzen im mikroskopischen Bild sowie auf dem Monitor während der Auswertung subjektiv nicht zu erfassen.

Gleiches gilt für die durch Epinephrin bzw. durch die Stammlösung erzeugten Veränderungen von Motilität und Spermengeschwindigkeit. Eine Wirkung von Epinephrin auf diese Parameter konnte mit dieser Versuchsanordnung nicht nachgewiesen werden (Tab. 12, Abb. 6).

Nach dem Zusatz von 10 mM Koffein war ein Anstieg der Geschwindigkeit von 75 - 102 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ und der Motilität von 54 - 62 % zu beobachten (Differenz jeweils $P \leq 0,05$, Tab. 11, Abb. 5). Auf einen eigenen Ansatz für das Lösungsmittel von Koffein war verzichtet worden, da hierzu der auch sonst benutzte Sperma verdünner verwendet worden war.

SCHLUSSFOLGERUNG:

Alle Ergebnisse belegen, daß das hier überprüfte Verfahren der Videomikrographie zur Messung von Spermengeschwindigkeit und -motilität beim Rind geeignet ist. Abhängig von der Zahl der Beobachtungen an einer Spermaprobe ergeben sich sehr gute bis ausrei-

chende Meßgenauigkeiten. Damit konnte nachgewiesen werden, daß Motilität und Geschwindigkeit nicht immer gleichsinnig auf äußere Einwirkungen (Temperatur, Konservierung) reagieren. Um weitere Informationen über den Parameter Geschwindigkeit, vor allem auch bezüglich seiner Bedeutung für das Befruchtungsvermögen einer Spermaprobe, zu erhalten, bedarf es des Einsatzes dieses Verfahrens im Routinebetrieb der künstlichen Besamung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe der Videomikrographie wurden die Geschwindigkeit und die Motilität (= Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) von Bullenspermien gemessen und damit der Einfluß von Temperatur, Konservierung sowie pharmakologischen Substanzen (Kallikrein + Humanserum, Koffein, Epinephrin) untersucht.
2. Abhängig von der Zahl der Beobachtungen, ergab sich eine sehr gute bis ausreichende Meßgenauigkeit. Bei Messungen von 300 Spermien pro Ejakulat wurden Vertrauensbereiche von $\pm 2,8\%$ für die Geschwindigkeit und $\pm 4,7\%$ für die Motilität ermittelt (Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$).
3. Motilität und Geschwindigkeit verhalten sich in einem Temperaturbereich von $+ 20$ bis $+ 40^\circ\text{C}$ nicht gleich. Während die Geschwindigkeit mit der Temperatur linear ansteigt, erreicht die Motilität zwischen $+ 25$ und $+ 27^\circ\text{C}$ Werte, die nahezu denen bei $+ 38$ bis $+ 40^\circ\text{C}$ entsprechen. Dieser Effekt war sowohl bei frisch verdünntem, als auch bei bis zu 72 Stunden bei $+ 5^\circ\text{C}$ gelagertem Sperma zu beobachten.
4. Eine Flüssigkonservierung bis zu 72 Stunden bewirkte, unabhängig von den Meßtemperaturen (im Bereich von $+ 20$ und $+ 38^\circ\text{C}$), einen zwar signifikanten aber nicht gravierenden Abfall der Spermengeschwindigkeit und -motilität. Die Tiefgefrierkonservierung veränderte die Geschwindigkeit motiler Spermien nicht, verminderte aber den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien.
5. Von den untersuchten Substanzen Kallikrein + Humanserum, Koffein und Epinephrin war nur nach Zugabe von Epinephrin kein stimulierender Effekt auf Geschwindigkeit und Motilität der Spermien nachzuweisen.
6. Mit Hilfe der Videomikrographie konnten experimentell induzierte Veränderungen der Geschwindigkeit und Motilität von Bullenspermien objektiv belegt werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß diese beiden Parameter sich nicht immer

gleichsinnig verhalten. Ein Einsatz der Videomikrographie in der Praxis könnte zur Klärung der biologischen Bedeutung der Spermiengeschwindigkeit und ihrer Beziehung zum Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien beitragen.

6. SUMMARY

"Investigations concerning the measurement of motility and velocity in bull spermatozoa with the aid of videomicrography"

1. The velocity and motility (= percent forward moving spermatozoa) of bull sperm were determined with the aid of videomicrography. In addition, the effect of temperature, conservation process and of pharmacological substances (kallikrein, coffein and epinephrine) were examined.
2. Depending on the number of spermatozoa measured the accuracy of measurement varied from very good to adequate. The interval of confidence based in measurements of 300 sperm cells per ejaculate was $\pm 2,8 \%$ for the velocity and $\pm 4,7 \%$ for the motility (probability of error $P \leq 0,05$).
3. Motility and velocity react differently between 20 and 40°C. The velocity increases steadily as the temperature rises, whereas the motility reaches between 25 and 27°C values near those found between 38 and 40°C. This was observed in freshly extended sperm, as well as in spermatozoa stored up to 72 hours at + 5°C.
4. A significant but not decisive decline in velocity and motility was found after storage of extended semen at + 5°C up to 72 hours. This effect was not dependent on the temperature used during measurements (+ 20°C to + 38°C). The velocity of motile sperm was not altered through deep-freeze preservation, whereas the percentage of forward moving spermatozoa was reduced.
5. The effect of three pharmacological substances (kallikrein + human serum, caffen and epinephrine) were investigated. Only epinephrine was shown to have no stimulating effect on the velocity and motility of sperm.
6. Experimentally induced changes in velocity and motility in bull spermatozoa can be objectively determined with video-

micrography. It could be demonstrated that these two parameters do not always show similar changes. The use of video-micrography in practice could clarify the biological significance of velocity in spermatozoa and its relation to the percentage of progressive motile sperm cells.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ADOLPHI, H. (1905):

Die Spermatozoen der Säugetiere schwimmen gegen den Strom.
Anat.Anz. 26, 549-559.

AMANN, R.P. and H.R. HAMMERSTEDT (1980):

Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm.
Biol.Reprod. 23, 647-656.

AMANN, R.P. and M.T. O'CONNOR (1980):

Evaluation of spermatozoal motility by computer.
Proc.IX.Intern.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., 16.-20. Juni 1980, Vol. 3, 290.

AREFEV, I.M., A.P. ESKOV und G.G. KOZLOV (1978):

Determination of activity of sperm by the light scattering method.
Bull.Exp.Biol.Med. 85, 249-252.

ATHERTON, R.W. (1979):

A review of the spectrophotometric quantitation of spermatozoon motility.

In: FAWCETT, D.W. and J.M. BEDFORD, In the spermatozoon, Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

ATHERTON, R.W., E.W. RADANY and K.L. POLAKOSKI (1977):

Quantitation of human motility.

In: HAFEZ, E.S.E., Techniques of human andrology, Biomedical Press, Elsevier/North Holland.

BAKER, F.N., R.G. CRAGLE, G.W. SALISBURY and N.L. VAN DEMARK (1957):

Spermatozoan velocities in vitro.
Fert.Steril. 8, 149-155.

BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.W. LENZ, R.L. AX, B.D. BAVISTER and N.L. FIRST (1983):

Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes.
Biol.Reprod. 28, 717-725.

BAR-SAGIE, D., A. MAYEVSKY and B. BARTOEV (1980):

A new optical technique for evaluating motility of ram and bull ejaculated spermatozoa.
Int.J.Androl. 3, 198-209.

BARTAK, V. (1971):

Sperm velocity test in clinical practise.
Int.J.Fertil. 16, 107-112.

- BAVISTER, B.D. A.F. CHEN and P.C. FU (1979):
Catecholamine requirement for hamster sperm motility in vitro.
J.Reprod.Fert. 56, 507-513.
- BOSSELAR, C.A. and N. SPRONK (1952):
A physical method for determination of the motility and concentration of spermatozoa.
Nature 169, 18-19.
- BOSSELAR, C.A., N. SPRONK and G.C. VAN DAM (1955):
An apparatus for measuring the motility of sperm cells.
J.Agricult. 46, 417-419.
- BROWN, R.H.J. and J.A. POPPLE (1955):
Multiple flash photography.
Med.Biol.Ill. 5, 23-28.
- CASTENHOLZ, A. (1974):
Photochymographische Registriermethode zur Darstellung und Analyse der Spermatozoenbewegungen.
Andrologia 6, 155-168.
- CRAIG, T., F.R. HALLET and B. NICKEL (1982):
Motility analysis of circularly swimming bull spermatozoa by quasi-elastic light scattering and cinematography.
Biophys.J. 38, 63-70.
- DOTT, H.M. and G.C.A. FORSTER (1979):
The estimation of sperm motility in semen on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer.
J.Reprod.Fert. 55, 161-166.
- ELLIOT, D.F., J.K. SHERMANN, E.J. ELLIOT and J. SULLIVAN (1973):
A photo method of measuring sperm motility.
J.Anim.Sci. 37, 310.
- EYKHOUT, P. and R. RIKMENSPOEL (1960):
High speed flash cinematography applied studies of the movement of bull spermatozoa.
Res.Film 3, 304.
- GARBERS, D., N.L. FIRST, J.J. SULLIVAN and H.A. LARDY (1971):
Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine.
Biol.Reprod. 5, 336-339.
- GASSNER, F.X., J.W. GOLDZIEHER, J.F. MASKEN and M.L. HOPWOOD (1959):
The objective measurement of sperm motility.
Fert.Steril. 10, 488-501.

GLOVER, F.A. (1978):

Physical method of measuring the motility of bull spermatozoa.
Nature 219, 1263-1264.

GRAVE, B.H. and R.C. DOWNING (1928):

The longevity and swimming ability of spermatozoa.
J.Exp.Zool. 51, 383-388.

GRAY, J. (1958):

The movement of the spermatozoa of the bull.
J.Exp.Biol. 35, 96-108.

HALLET, F.R., T. CRAIG and J. MARSH (1978):

Swimming speed distributions of bull spermatozoa as determined by quasi-elastic light scattering.
Biophys.J. 21, 203-216.

HARVEY, J.D. and M.W. WOOLFORD (1980):

Laser light scattering studies of bull spermatozoa. I. Orientational effects.
Biophys.J. 31, 147-156.

HENLE, J. (1841):

Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. II. Eingeweidelehre.

Vierweg and Son, Braunschweig, 1873, p. 954.

JANICK, J. and J. MacLEOD (1970):

The measurement of human spermatozoan motility.
Fert.Steril. 21, 140-145.

JECHT, E.W. and J.J. RUSSO (1973):

A system for the quantitative analysis of human sperm motility.
Andrologia 5, 215-221.

JOUANNET, P., B. VOLCHINE, P. DEGUENT, C. SERRES and G. DAVID (1977):

Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in series of human sperm.
Andrologia 9, 36-48.

KATZ, D.F. and H.M. DOTT (1975):

Methods of measuring swimming speed of spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 45, 263-272.

KATZ, D.F., R.N. MILLS and T.R. PRITCHETT (1978):

The movement of human spermatozoa in cervical mucus.
J.Reprod.Fert. 53, 259-265.

KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1980):

A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus.
Fert.Steril. 33, 179-186.

- KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1981):
Sperm motility assessment by videomikrography.
Fert.Steril. 35, 188-193.
- LEIBFRIED, M.L. and B.D. BAVISTER (1982):
Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization
in the golden hamster.
J.Reprod.Fert. 66, 87-93.
- LEIDL, W., R. PRINZEN, W.-B. SCHILL and H.FRITZ (1975):
The effect of kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro.
Kininogenases 2, Schattauer Verlag, Stuttgart, 167-170.
- LEVIN, R.M., J. SHOFER and S.H. GREENBERG (1980):
A quantitative method for determining the effects of drugs on spermatozoal motility.
Fert.Steril. 33, 631-635.
- LIU, Y.T. and P.K. WARME (1977):
Computerized evaluation of sperm cell motility.
Comp.Biomed.Res. 10, 127-138.
- LLOYD-JONES, A. and HAYES (1918):
Sexual activity of male rabbits-motility.
J.Exp.Zool. 25, 477-487.
- LOTT, G. (1872):
Zur Anatomie und Physiologie der Cervix uteri.
Ferdinand Enke Verlag, Erlangen, p. 140.
- LUSTIG, G. and P.E. LINDAHL (1970):
Activation of motility in bull and rabbit spermatozoa by ultrasonic treatment recorded by a photographic method.
Int.J.Fertil. 15, 135-142.
- LYSIKIEWICZ, A. and G. ENHORNUNG (1983):
Tricolorphotography for assessment of spermatozoa motility.
Am.J.Obstet.Gynec. 145, 229-233.
- MAKLER, A. (1978a):
A new chamber for rapid sperm count and motility estimation.
Fert.Steril. 30, 313-318.
- MAKLER, A. (1978b):
The thickness of microscopically examined seminal sample and its relationship to sperm motility estimation.
Int.J.Androl. 1, 213-219.
- MAKLER, A. (1979a):
Index of longevity - a new definition of an index for sperm quality evaluation.
Int.J.Andrology 2, 21-31.

MAKLER, A. (1979b):

Simultaneous differentiation between motile, non motile and dead human spermatozoa by combining supravital staining and multiple exposure photography procedures.

Int.J.Andrology 2, 32-42.

MAKLER, A. (1980a):

Use of the elaborated multiple exposure photography method in routine sperm motility analysis and for research purposes.

Fert.Steril. 33, 160-166.

MAKLER, A. (1980b):

The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.

Fert.Steril. 33, 337-338.

MAKLER, A., J. ZAIDISE, E. PALDI and J.M. BRANDES (1979a):

Factors affecting sperm motility. I. In vitro change in motility with time after ejaculation.

Fert.Steril. 31, 147-154.

MAKLER, A., J. ITS KOVITZ, J.M. BRANDES and E. PALDI (1979b):

Sperm velocity and percentage of motility in 100 normospermic specimens analysed by the multiple expose photography (MEP) method.

Fert.Steril. 31, 155-161.

MAKLER, A., Z. BLUMENFELD, J.M. BRANDES and E. PALDI (1979c):

Factors affecting sperm motility. II. Human sperm velocity and percentage of motility as influenced by semen dilution.

Fert.Steril. 32, 443-449.

MAKLER, A., E. MAKLER, J. ITZ KOVITZ and J.M. BRANDES (1980a):

Factors affecting sperm motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein and other metabolically active compounds.

Fert.Steril. 33, 624-630.

MAKLER, A., M. TATCHER and J. MOHILEVER (1980b):

Sperm semi-autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques.

Int.J.Fert. 25, 62-66.

MASSANYI, L. (1977):

Telerecording record of spermatozoa motility.

Pol.Morphol. 25, 119-120.

MILLIGAN, M.P., S.J. HARRIS and K.J. DENNIS (1978):

The effect of temperature on the velocity of human spermatozoa as measured by time-elapse-photography.

Fert.Steril. 30, 592-594.

MOELLER, A.N. and P.D. VAN DEMARK (1956):
In vitro speeds of bovine spermatozoa.
Fert.Steril. 6, 506-512.

MÜLLER, E. und J. SZILAGYI (1964):
Eine photographische Methode zur objektiven Beurteilung der Beweglichkeit von Spermien in verdünntem Bullenejakulat.
Proc.V.Congr.Intern.Reprod.Anim.Fecond.Artif., Vol. 4, 335-340, Trento.

NEVO, A.C. and R. MOHAN (1969):
Migration of motile spermatozoa into sperm-free medium and the dilution effect.
J.Reprod.Fert. 18, 379-381.

OJAKIAN, G.K. and D.F. KATZ (1973):
A simple technique for the measurement of swimming speed of chlamydomonas.
Exp.Cell Res. 81, 487-489.

OVERSTREET, J.W., D.F. KATZ, F.W. HANSON and J.R. FONSEN (1979):
A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics.
Fert.Steril. 31, 162-172.

PAUFLER, S.K. (1974):
Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch.
Verlag Schaper, Hannover, 78-79.

PHILLIPS, D.M. (1972):
Comparative analysis of mammalian sperm motility.
J.Cell Biol. 53, 561-573.

PHILLIPS, R.W. and F.N. ANDREWS (1937):
The speed of travel of ram spermatozoa.
Anat.Rec. 68, 127-132.

REVELL, S.G. and P.D.P. WOOD (1978):
A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 54, 123-126.

RICKMENSPOEL, R. (1957):
Photoelectric and cinematographic measurements of the "motility" of bull sperm cells.
Thesis, Utrecht.

RICKMENSPOEL, R. and G. VAN HERPEN (1956):
A microscopic film of the movements of bull sperm cells in dark-field illumination.
Experientia 12, 160.

ROSS, D.A., H.S. DHADWAL and J.A. FOULKES (1983):
Laser measurement of the motility of bull spermatozoa in egg-yolk
diluent.

J.Reprod.Fert. 67, 263-268.

ROTHSCHILD, LORD (1953a):

The movements of spermatozoa.

Ciba Fundation Symposium, Mammalian Germ Cells, 122-130, Little
Brown and Company, Boston.

ROTHSCHILD, LORD (1953b):

A new method of measuring sperm speeds.

Nature 171, 512-513.

SATO, H. (1980):

Studies on the components of kallikrein-kinin system and treat-
ment of male infertility.

Keio J.Med. 29, 19-38.

SCHILL, W.B. (1975):

Caffein- and kallikrein-induced stimulation of human sperm
motility: A comparative study.

Andrologia 7, 229-236.

SCHLENK, W. und H. KAHMANN (1935):

Ein Verfahren zur Messung der Spermatozoenbewegung.

Pflüg.-Arch.Ges.Physiol. 236, 398-404.

SCHWARTZ, B.A. and H.H. ZINSSER (1954):

Sperm motility: A simple method for analysis.

Am.J.Med. 17, 124.

SERRES, C., D. FENEUX and G. DAVID (1982):

Microcinematographic analysis of the motility of human
spermatozoa incubated with caffeine.

Andrologia 14, 454-460.

SOKOLOSKI, J.E., L. BLASCO, D. STOREY and D.P. WOLF (1977):

Turbimetric analysis of human sperm motility.

Fert.Steril. 28, 1337-1341.

STEINER, R., N. HOFMANN, R. HARTMANN und R. KAUFMANN (1977):

Die Anwendung der Laser Doppler Spektroskopie zur Analyse der
Spermatozoen Motilität in verschiedenen Medien.

Sep.aus: Fortschritte der Fertilitätsforschung V, Große Verlag.

STEINER, R., N. HOFMANN, R. HARTMANN und R. KAUFMANN (1978):

Kallikrein und Prostaglandin E₁ - vergleichende Untersuchungen
zur Motilitätssteigerung von Spermatozoen mittels der Laser
Doppler Spektroskopie.

Sep.aus: Fortschritte der Andrologie 6, 26-34, Große Verlag.

- TAMPION D. and R.A. GIBBONS (1963):
Swimming rate of bull spermatozoa in various media and the effect of dilution.
J.Reprod.Fert. 5, 259-275.
- TIMOURIAN, H. and G. WATCHMAKER (1970):
Determination of spermatozoan motility.
Dev.Biol. 21, 62-72.
- TSO, W.W., W.M. LEF, K.C. TSUI and Y.F. LAM (1980):
Assay of progressiv motion of boar spermatozoa.
Arch.Andrology 4, 315-326.
- VANDEMARK, N.L., G.W. SALISBURY and A.N. MOELLER (1958):
Exploration of electronic methods for evaluating sperm motility.
Science 127, 286-287.
- VAN DUIJN, C. and R. RICKMENSPOEL (1960):
The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations, derivied from photo-electric measurements.
J.Agric.Sci. Camb. 54, 300-309.
- VIERORDT, H. (1888):
Anatomische, physiologische und physikalische Daten und Tabellen.
2. Auflage (1893), Jena, 252.
- WALL, K.A. and M.A. BOONE (1973):
Objective measurement of sperm motility.
Poultry Sci. 52, 657-660.
- WALL, R.J., D.R. HAGEN and R.H. FOOTE (1980):
Measurement of bull sperm motility and velocity.
In: 810603, Testicular development, structure and function, 455-461. Raven Press, New York, USA.
- WALTON, A. (1952):
Flow orientation as a possible explantation of "wave-motion" and "Rheotaxis" of spermatozoa.
Exp.Biol. 29, 520-531.

LEBENS LAUF

Am 10.2.1952 wurde ich, Peter Riemke, als Sohn der Geschäftsfrau Emma Riemke, geb. Maurer, und des Sportlehrers Alv Riemke in Nürnberg geboren.

Ab 1959 besuchte ich die Volksschule in Nürnberg. Von dort kam ich 1963 an das Hans-Sachs-Gymnasium in Nürnberg und wechselte 1967 an das Wolfram-von Eschenbach-Gymnasium in Schwabach, das ich 1973 mit dem Abitur verließ.

Nach der Erfüllung meiner Wehrpflicht studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen 2 Semester Geologie und Chemie. Im Wintersemester 1975 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich am 7.4.1981 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit 1981 bin ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

Bei Herrn Professor Dr. W. Leidl möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. W.-B. Schill, Dermatologische Klinik und Poliklinik der Universität München, der das benötigte Kallikrein zur Verfügung stellte.

Bei Herrn Professor Dr. Dr. K. Osterkorn, Institut für Tierzucht der Universität München, bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Schließlich danke ich allen, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben, insbesondere bei Frau E. Schüssler und Herrn Dr. J. Braun.

